

**Interaktion von Retinolsäurerezeptoren und Androgenrezeptor
bei Androgen- und Retinoid- Stimulation von Prostatazellen
und Prostatakarzinomzellen
- möglicher Ansatz zur Therapie des Prostatakarzinoms**

HABILITATIONSSCHRIFT

Zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. habil.

(doctor medicinae habilitatus)

vorgelegt von

Dr. med. Frank Richter

aus Magdeburg

Präsident: Prof. Dr. rer. nat J.Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Eingereicht im September 2001

Die Ergebnisse der vorliegenden Habilitationsschrift wurden in folgenden Abstracts und Publikationen veröffentlicht (chronologisch geordnet):

- (1) **F. Richter**: "Influence of retinoic acid on cell proliferation of NRP152 and NRP154 -a cancerogenous and a non-cancerogenous cell line from rat prostate." Abstract.
Summer Research Conference "Advances in Cell Biology" of the American Urological Association (AUA), 9.-11. August 1996, Houston, Texas, USA.
- (2) M.T. Li, **F. Richter**, H.F.S. Huang, R. J. Irwin:
"Interaction of testosterone and retinoic acid on human prostate cancer cells." Abstract.
37th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 13.-17. Dezember 1997; Washington DC, USA.
- (3) **F. Richter**, H.F.S. Huang, M.T. Li, D. Danielpour, R.J. Irwin:
" Tumorigenesis of rat prostate epithelial cells is associated with an altered retinoic acid / RAR- pathway." Abstract. International Symposium on Biology of Prostate Growth. 15.-18. März 1998. NIH, Bethesda, Maryland, USA
- (4) **F. Richter**, H. F.S. Huang, M.T. Li, R. Irwin:
"Expression von Retinolsäurezeptor (RAR)mRNA in humanem Prostatakarzinom und Prostatagewebe." Abstract. Jahrestagung der "Deutschen Gesellschaft für Urologie"
Hamburg, 23. - 26. September 1998.
- (5) **F. Richter**: "Differences in expression of retinoic acid receptor mRNAs in human prostate versus prostate cancer." Abstract. Foundation of the Clinical Research Center and
Institute for Biomedical Research, Hackensack University Medical Center, Hackensack, New Jersey, USA, 13. November 1998.
- (6) **F. Richter**, H.F.S. Huang, M.T. Li, D. Danielpour, R.J. Irwin:
"Tumorigenesis of rat prostate epithelial cells is associated with an altered retinoic acid / RAR- pathway." Prostate **38**:4; 340-341, 1999.
- (7) **F. Richter**, H.F.S. Huang, M.T. Li, R.J. Irwin Jr:
"Retinoid and androgen regulation of cell growth; Epidermal Growth Factor and Retinoic Acid Receptors in normal and carcinoma rat prostate cells." Molecular and Cellular Endocrinology **153**: 29-38, 1999.

- (8) **F. Richter**, D. O`Keefe, D.J. Bacich, A. Uchida, M. Bisogna , W.D.W. Heston:
“Co-incubation of microvascular endothelial cells with breast cancer cell line stimulates PSMA-expression in vitro.” Poster, Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), San Francisco, 5. April, 2000.
Proceedings of the American Association for Cancer Research **41**: 794 ; 2000 (Abstract 5051).
- (9) **F. Richter**, D. O`Keefe, D.J. Bacich, A. Uchida, M. Bisogna , W.D.W. Heston:
“Co-incubation of microvascular endothelial cells with breast cancer cell line stimulates PSMA-expression in vitro.” Abstract, 95th Annual Meeting of the American Urological Association (AUA), Atlanta, USA, 30. April, 2000.
- (10) Li, M.-T., **Richter, F.**, Hsiao, P.-W., Wang, C, Chang, C., Irwin, R.J., Huang, H.F.S.:
“ Androgen and retinoic acid interaction in LNCaP cells. Effects on cell proliferation and expression of retinoic acid receptor and epidermal growth factor receptor. (Molecular and Cellular Endocrinology (in Revision)).
- (11) Li, M.-T., **Richter, F.**, Hsiao, P.-W., Wang, C., Irwin, R.J., Huang, H.F.S.:
“Differential Expression of Retinoid acid receptors in the Rat Prostate – Effect of Anatomic Location and Castration.” (Endocrinology, eingereicht 1/2001).
- (12) **Richter F.**, Joyce, A. , Fromowitz, F, Irwin, R.J., Huang, H.F.S.:
Expression of Retinoid Acid Receptors in Human Prostate and Prostate Cancer. Journal of Cellular Endocrinology and Metabolism (eingereicht 4/2001).

VERZEICHNIS DER IN DER ARBEIT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

| | |
|--------|--|
| AR | - Androgenrezeptor |
| BSA | - Rinderserum-Albumin |
| CDNA | - Komplementäre DNA |
| CSS | - Charcoal stripped serum |
| CYT351 | - PSMA-Antikörper (gegen extrazelluläres Epitop) |
| DHT | - Dehydrotestosteron |
| DMEM | - Dulbecco Modified Minimal Medium |
| DMSO | - Dimethylsulfoxid |
| DNA | - Desoxiribonukleinsäure |
| EGF | - Endothelial Growth Factor |
| EGF-R | - Endothelial Growth Factor Receptor |
| FCS | - Fetal calf serum |
| CFCS | - Charcoal stripped fetal calf serum |
| IGF-1 | - Insulin Dependent Growth Factor |
| IGF1-R | - Insulin Dependent Growth Factor Receptor |
| LNCaP | - Humane androgenabhängige Prostatakarzinomzelllinie |
| MRNA | - Messenger RNA |
| MNU | - Methyl-nitrosurea (Methyl-Nitroso-Harnstoff) |
| NRP152 | - Prostataepithelzelllinie der Ratte (benigne) |
| NRP154 | - Prostataepithelzelllinie der Ratte (induzierte Malignität) |
| PAGE | - Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Poly | - Polyadenylierte RNA =mRNA |
| PC3 | - Menschliche androgen-unabhängige |
| PCR | - Polymerase- Kettenreaktion |
| PBS | - Phosphate buffered saline |
| RA | - Retinoic Acid (Retinolsäure) |
| RAR`s | - Retinoid Acid - Rezeptoren (Subtypen α ; β ; γ) |
| RXR`s | - Retinoid Rezeptoren |
| RNA | - Ribonukleinsäure |
| RT | - Reverse Transkription (RNA – cDNA) |
| T | - Testosteron |
| TBST | - Tween-supplementiertes PBS |

Meiner Frau Bettina und meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| VERZEICHNIS DER IN DER ARBEIT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN | 4 |
| 1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG | 13 |
| 2 STAND DER FORSCHUNG | 14 |
| 2.1 ANDROGENREZEPTOR – MOLEKULARBIOLOGIE, FUNKTION UND KLINISCHE BEDEUTUNG | 15 |
| 2.2 RETINOIDREZEPTOREN UND RETINOIDE | 16 |
| 2.3 ZELLKULTURMODELLE BEIM PROSTATAKARZINOM | 18 |
| 2.4 TIERMODELLE DES PROSTATAKARZINOMS UND DEREN LIMITIERUNGEN | 20 |
| 2.5 THERAPEUTISCHER EINSATZ VON RETINOIDEN BEI MALIGNEN TUMOREN | 21 |
| 3 MATERIALIEN UND METHODEN | 23 |
| 3.1 VERWENDETE ZELLINIEN UND DEREN CHARAKTERISIERUNG | 23 |
| 3.2 TIERMODELL NACH POLLARD (LOBUND-WISTAR-RATTE) | 24 |
| 3.3 GEWINNUNG VON HUMANEM PROSTATAGEWEBE-GEWEBEAUFBEREITUNG | 24 |
| 3.4 BESTIMMUNG DER ZELLPROLIFERATION | 25 |
| 3.5 NORTHERN BLOTS MIT cDNA GEGEN ARMRNA UND RARMRNA | 26 |
| 3.6 ANALYSE DER GEN-EXPRESSION MIT GEN-ARRAYS (NRP152 UND NRP154) | 27 |
| 3.7 RT-PCR MIT RAR α , β , γ - PRIMERN | 27 |
| 3.8 WESTERN BLOTS MIT ANTIKÖRPERN GEGEN RAR α , RAR β , RAR γ UND EGFR | 30 |
| 3.9 LIGANDEN-BINDUNGS-ASSAYS MIT [125I]-EGF UND [125I]-IGF1 | 31 |
| 3.9.1 Zellmembran- Präparation | 31 |
| 3.9.2 Liganden-Bindungs-Assays | 31 |
| 3.10 IMMUNHISTOCHEMIE MIT ANTIKÖRPERN GEGEN RAR α , RAR β , RAR γ UND EGFR | 32 |
| 3.11 DATENANALYSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG | 33 |
| 4 ERGEBNISSE | 34 |
| 4.1 BESTIMMUNG DER ZELLPROLIFERATION | 34 |
| 4.2 AR-MRNA UND RAR-MRNA- EXPRESSION | 38 |
| 4.3 GEN-ARRAYS ZUR IDENTIFIZIERUNG UNTERSCHIEDLICHER GENEXPRESSION ZWISCHEN NRP152 UND NRP154 | 43 |
| 4.4 EINFLUSS DER ANDROGENBEHANDLUNG AUF EXPRESSION VON ONKOGENEN – UNTERSCHIEDE ZWISCHEN NRP152/NRP154 | 44 |
| 4.5 RT-PCR VON MENSCHLICHEM PROSTATAGEWEBEN (BENIGNE VERSUS KARZINOM) MIT RAR- PRIMERN | 45 |
| 4.6 WESTERN BLOTS MIT ANTIKÖRPERN GEGEN RAR α , RAR β , RAR γ , EGFR | 49 |
| 4.7 LIGANDEN-BINDUNGS-ASSAYS MIT [125I]-EGF UND [125I]-IGF1 | 53 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.8 | IMMUNHISTOCHEMIE MIT ANTIKÖRPERN GEGEN RAR α , RAR β , RAR γ | 57 |
| 4.8.1 | <i>Zelllinien</i> | 57 |
| 4.8.2 | <i>Immunhistochemie mit Rattenprostaten</i> | 60 |
| 4.8.2.1 | Unterschiede in der Expression der RAR α , RAR β , RAR γ in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Rattenprostata..... | 60 |
| 4.8.2.2 | Einfluß von Kastration auf die Expression der RAR α , RAR β , RAR γ im Rattenmodell..... | 64 |
| 4.8.2.3 | Einfluß einer chemisch induzierten Karzinogenese auf die Expression der RAR α , RAR β , RAR γ im Rattenmodell | 67 |
| 4.8.3 | <i>Immunhistochemie – Gewebsschnitte mit humaner Prostata</i> | 69 |
| 4.9 | VERGLEICH DER EXPRESSION VON RAR α , RAR β , RAR γ -MRNA IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN UND ZELLINIEN..... | 72 |
| 5 | DISKUSSION | 73 |
| | LITERATURVERZEICHNIS | 78 |
| | DANKSAGUNG | 94 |
| | ERKLÄRUNG | 96 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| ABB. 1: STRUKTUR DER RETINOID-REZEPTOREN $RAR\alpha,\beta,\gamma$ | 17 |
| ABB. 2: SCHEMATISIERTER MECHANISMUS DER RA/RAR-INTERAKTION | 18 |
| ABB. 3: ZELLPROLIFERATION VON NRP152 UND NRP154 IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT. JEDER PUNKT ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN. | 34 |
| ABB. 4: ABHÄNGIGKEIT DER ZELLPROLIFERATION BEI NRP152 UND NRP154 VON DER RA-KONZENTRATION JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN..... | 35 |
| ABB. 5: ABHÄNGIGKEIT DER ZELLPROLIFERATION BEI NRP152 UND NRP154 VON DER TESTOSTERON- KONZENTRATION. JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN. | 35 |
| ABB. 6: ABHÄNGIGKEIT DER ZELLPROLIFERATION BEI LNCAP-ZELLEN VON DER TESTOSTERON- KONZENTRATION..... | 36 |
| ABB. 7: ABHÄNGIGKEIT DER ZELLPROLIFERATION BEI LNCAP-ZELLEN VON DER RA-KONZENTRATION. JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN. | 37 |
| ABB. 8: ABHÄNGIGKEIT DER ZELLPROLIFERATION BEI PC3-ZELLEN VON DER TESTOSTERON-KONZENTRATION JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN..... | 37 |
| ABB. 9: ABHÄNGIGKEIT DER ZELLPROLIFERATION BEI LNCAP-ZELLEN VON DER RA-KONZENTRATION. JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN. | 38 |
| ABB. 10: (A) VERGLEICH DER EXPRESSION DER ANDROGENREZEPTOR (AR)-mRNA UND DER RAR ZWISCHEN NRP152 UND NRP154. (B) VERGLEICH DER EXPRESSION DER $RAR\alpha$ - UND $RAR\gamma$ -mRNA ZWISCHEN NRP154 UND NRP152. $RAR\gamma$ UP-REGULIERT IN NRP152. $RAR\alpha$ UP-REGULIERT IN NRP154 | 39 |
| ABB. 11: EXPRESSION VON $RAR\alpha$ UND $RAR\gamma$ -mRNA IN NRP152 IN ABHÄNGIGKEIT VON DER TESTOSTERON- KONZENTRATION. REPRÄSENTATIVE NORTHERN-BLOTS (OBERES BILD) UND QUANTITATIVE ANALYSE DES DOSIS-EFFEKTS VON TESTOSTERON AUF DIE EXPRESSION VON $RAR\alpha$ UND $RAR\gamma$ -mRNA NACH 6 STUNDEN BEHANDLUNG. JEDE BANDE WURDE DURCH HYBRIDISIERUNG VON 15 μ G POLY(A)-RNA ISOLIERT VON DER NRP152-ZELLSUSPENSION GEWONNEN. DETEKTION DURCH [53 P]-MARKIERTE cDNA FÜR $RAR\alpha$ UND $RAR\gamma$ (PROF.P.CHAMBON, STRASSBOURG). DIE BANDENDICHTE JADES TRANSKRIPTS IN JEDER PROBE WURDE NORMALISIERT GEGEN 18S-RNA UND ALS PROZENT DES NULLWERTES (UNBEHANDELTE PROBEN =100%) BERECHNET. JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN. A: SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE VERGlichen MIT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLGRUPPE, $P<0.05$ | 40 |
| ABB. 12: EXPRESSION VON $RAR\alpha$ UND $RAR\gamma$ -mRNA IN NRP154 IN ABHÄNGIGKEIT VON DER TESTOSTERON- KONZENTRATION. REPRÄSENTATIVE NORTHERN-BLOTS (OBERES BILD) UND QUANTITATIVE ANALYSE DES DOSIS-EFFEKTS VON TESTOSTERON AUF DIE EXPRESSION VON $RAR\alpha$ UND $RAR\gamma$ -mRNA NACH 6 STUNDEN BEHANDLUNG. JEDE BANDE WURDE DURCH HYBRIDISIERUNG VON 15 μ G POLY(A)-RNA ISOLIERT VON DER NRP152-ZELLSUSPENSION GEWONNEN. DETEKTION DURCH [53 P]-MARKIERTE cDNA FÜR $RAR\alpha$ UND $RAR\gamma$ (PROF.P.CHAMBON, STRASSBOURG). DIE BANDENDICHTE JADES TRANSKRIPTS IN JEDER PROBE WURDE NORMALISIERT GEGEN 18S-RNA UND ALS PROZENT DES NULLWERTES (UNBEHANDELTE PROBEN =100%) BERECHNET. JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 | |

| | |
|---|----|
| EXPERIMENTEN. A: SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE VERGlichen MIT DER UNBEHANDELTEN KONTROLLGRUPPE, $P < 0.05$ | 41 |
| ABB. 13: EXPRESSION VON $RAR\alpha$ UND $RAR\gamma$ -MRNA IN LNCAP-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER TESTOSTERON-KONZENTRATION. REPRÄSENTATIVE NORTHERN-BLOTS DEMONSTRIEREN DIE EXPRESSION VON $RAR\alpha$ - UND $RAR\gamma$ -MRNA NACH 6 STUNDEN BEHANDLUNG. JEDE BANDE WURDE DURCH HYBRIDISIERUNG VON 15 μ G POLY(A)-RNA ISOLIERT VON DER LNCAP-ZELLSUSPENSION GEWONNEN. DETEKTION DURCH [53 P]-MARKIERTE cDNA FÜR $RAR\alpha$ UND $RAR\gamma$ (PROF. P. CHAMBON, STRASSBOURG). DIE BANDENDICHTE JADES TRANSKRIPTS IN JEDER PROBE WURDE NORMALISIERT GEGEN 18S-RNA UND ALS PROZENT DES NULLWERTES (UNBEHANDELTE PROBEN = 100%) BERECHNET. | 42 |
| ABB. 14: MACRO- GEN-ARRAY (CLONTECH) UM UNTERSCHIEDE DER EXPRESSION VERSCHIEDENER GENE ZWISCHEN NRP152 UND NRP154 AUFZUFINDEN. A-E WAREN UP-REGULIERT IN NRP152. A-L WAREN UP-REGULIERT IN NRP154..... | 43 |
| ABB. 15: EXPRESSION VON ONKOGENEN C-MYC-MRNA WIRD DURCH ANDROGENE STIMULIERT. IN NRP152 ERFOLGTE KEINE ÄNDERUNG DER C-MYC-MRNA-EXPRESSION NACH GABE VON TESTOSTERON. IN NRP154 WURDE DIE EXPRESSION VON C-MYC-MRNA DURCH ANDROGENBEHANDLUNG STIMULIERT. DER EFFEKT WAR 15 MINUTEN NACH BEHANDLUNGSBEGINN NACHWEISBAR, UND DAURTE BIS 3 STUNDEN NACH BEHANDLUNG AN. | 44 |
| ABB. 16: RT-PCR MIT RNA VON HUMANEM PROSTATAGEWEBE. VERGLEICH DER EXPRESSION VON $RAR\alpha$ -RNA ZWISCHEN BENIGNEM [N=25] UND MALIGNEM [N=25] PROSTATAGEWEBE. PRIMER UND RT-PCR-PRODUKTE WIE IN TAB. 1 ANGEGBEN SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN KARZINOM UND BENIGNER PROSTATA ($N < 0.05$)..... | 46 |
| ABB. 17: RT-PCR MIT RNA VON HUMANEM PROSTATAGEWEBE. VERGLEICH DER EXPRESSION VON $RAR\beta$ -RNA ZWISCHEN BENIGNEM [N=25] UND MALIGNEM [N=25] PROSTATAGEWEBE. PRIMER UND RT-PCR-PRODUKTE WIE IN TAB. 1 ANGEGBEN SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN KARZINOM UND BENIGNER PROSTATA ($N < 0.05$)..... | 47 |
| ABB. 18: RT-PCR MIT RNA VON HUMANEM PROSTATAGEWEBE. VERGLEICH DER EXPRESSION VON $RAR\gamma$ -RNA ZWISCHEN BENIGNEM [N=25] UND MALIGNEM [N=25] PROSTATAGEWEBE. PRIMER UND RT-PCR-PRODUKTE WIE IN TAB. 1 ANGEGBEN SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN KARZINOM UND BENIGNER PROSTATA ($N < 0.05$)..... | 48 |
| ABB. 19: WESTERN BLOTS MIT PROTEINLYSATEN VON NRP154 UND NRP152-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT RA; MONOKLONALER $RAR\alpha$ - ANTIKÖRPER 1:200. ECL-SIGNAL-DETEKTION. | 49 |
| ABB. 20: WESTERN BLOTS MIT PROTEINLYSATEN VON NRP154 UND NRP152-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT RA; MONOKLONALER $RAR\alpha$ - ANTIKÖRPER 1:200. ECL-SIGNAL-DETEKTION. DIE BANDENDICHTE VON NRP152 = 100%. JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN. | 50 |
| ABB. 21: WESTERN BLOTS MIT PROTEINLYSATEN VON LNCAP-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT TESTOSTERON (T; 0-200nM) ; MONOKLONALER $RAR\alpha$ - ANTIKÖRPER 1:200. ECL-SIGNAL-DETEKTION. | 51 |

| | |
|--|----|
| ABB. 22: WESTERN BLOTS MIT ANTI-EGF-R-ANTIKÖRPER . 25µg PROTEIN VON ZELLYSATEN (NRP152) NACH BEHANDLUNG MIT TESTOSTERON (T), RA UND DEREN KOMBINATION. UNBEHANDELTE NRP152 ZUM VERGLEICH. | 52 |
| ABB. 23: WESTERN BLOTS MIT ANTI-EGF-R-ANTIKÖRPER. 25µg PROTEIN VON ZELLYSATEN (NRP154) NACH BEHANDLUNG MIT TESTOSTERON (T), RA UND DEREN KOMBINATION. UNBEHANDELTE NRP154 ZUM VERGLEICH. | 52 |
| ABB. 24: EFFEKTE VON 0.1µM RA, 20nM TESTOSTERON (T) UND DEREN KOMBINATION (RA+T) AUF DIE EXPRESSION VON EGFR-PROTEIN. QUANTITATIVE ANALYSE DER BANDENDICHTEN VON WESTERNBLOTS (ABB.19+20) MIT ANTIKÖRPER GEGEN EGF-R. RESULTATE SIND MITTELWERTE +/- SEM VON VIER IDENTISCHEN EXPERIMENTELLEN ANSÄTZEN. * KENNZEICHNET SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IM VERGLEICH ZUR UNBEHANDELTEN KONTROLLGRUPPE (=100% BANDENDICHTE; p<0.05). | 53 |
| ABB. 25: DIE EFFEKTE VON 0.1µM RA, 20nM TESTOSTERON (T) UND DEREN KOMBINATION (RA+T) AUF DIE VERFÜGBARKEIT VON EGF-R GEMESSEN MITTELS LIGANDEN-BINDUNGS-ASSAYS (A) BEI NRP152 UND (B) BEI NRP154 NACH VERSCHIEDENEN ZEITINTERVALLEN NACH BEHANDLUNG. JEDE SÄULE REPRESENTIERT DEN MEDIAN VON VIER EXPERIMENTEN UND IST ALS PROZENTUALE DIFFERENZ VON UNBEHANDELTEN KONTROLLEN AUSGEDRÜCKT. * KENNZEICHNET SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IM VERGLEICH ZUR UNBEHANDELTEN KONTROLLGRUPPE (=100% BANDENDICHTE; p<0.05). | 54 |
| ABB. 26: LIGANDENBINDUNGS-ASSAYS MIT LNCAP-ZELLMEMBRANEN INKUBIERT MIT [¹²⁵ I]-IGF1 STEIGENDER KONZENTRATION. RA= 24 STÜNDIGE INKUBATION MIT 0.1µM RETINOLSÄURE; T=24 STÜNDIGE INKUBATION MIT 20nM TESTOSTERON. JEDER PUNKT ENSTRICHT DEM MEDIAN VON VIER VERSUCHSANSÄTZEN. | 55 |
| ABB. 27: LIGANDENBINDUNGS-ASSAYS MIT NRP152-ZELLMEMBRANEN INKUBIERT MIT [¹²⁵ I]-IGF1 STEIGENDER KONZENTRATION. RA= 24 STÜNDIGE INKUBATION MIT 0.1µM RETINOLSÄURE; T=24 STÜNDIGE INKUBATION MIT 20nM TESTOSTERON. JEDER PUNKT ENSTRICHT DEM MEDIAN VON VIER VERSUCHSANSÄTZEN. | 56 |
| ABB. 28: LIGANDENBINDUNGS-ASSAYS MIT NRP154-ZELLMEMBRANEN INKUBIERT MIT [¹²⁵ I]-IGF1 STEIGENDER KONZENTRATION. RA= 24 STÜNDIGE INKUBATION MIT 0.1µM RETINOLSÄURE; T=24 STÜNDIGE INKUBATION MIT 20nM TESTOSTERON. JEDER PUNKT ENSTRICHT DEM MEDIAN VON VIER VERSUCHSANSÄTZEN. | 56 |
| ABB. 29: IMMUNCYTOCHEMIE VON NRP154 (A) UND NRP152 (B) MIT ANTI-RARα,β,γ-ANTIKÖRPERN (1:200; FARBDETEKTION MIT PEROXIDASE –DIAMINO BENZALDEHYD) | 58 |
| ABB. 30: SEMIQUANTITATIVE SUMMEN-SCORES VON IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN VON NRP152 UND NRP154, WIE IN ABB. 23 ANGEGEBEN. DIE DURCHSCHNITTLICHEN SUMMEN-SCORES SIND ALS BALKENDIAGRAMME DARGESTELLT, DIE MEDIAN+/-SEM VON ACHT EXPERIMENTEN BEINHALTEN (SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN GRUPPEN (p<0.01) SIND MITTELS * MARKIERT. | 59 |
| ABB. 31: UNTERSCHIEDLICHE EXPRESSION DER RARMRNAs IN ABHÄNGIGKEIT VON DER LOKALISATION IN DER PROSTATA DER RATTE (NORTHERN BLOTS MIT 15µg POLY(A)RNA ISOLIERT AUS DEVENTRALEN, | |

| | |
|--|----|
| DORSALEN LOBULUS DER RATTEN-PROSTATA ODER DER GESAMTEN RATTEN-PROSTATA. NORMALISIERUNG GEGEN 18S-RNA..... | 60 |
| ABB. 32: UNTERSCHIEDLICHE EXPRESSION DER RARMRNAs IN ABHÄNGIGKEIT VON DER LOKALISATION IN DER PROSTATA DER RATTE (NORTHERN BLOTS MIT 15µg POLY(A)RNA ISOLIERT AUS DEVENTRALEN, DORSALEN LOBULUS DER RATTEN-PROSTATA ODER DER GESAMTEN RATTEN-PROSTATA. QUANTIFIZIERUNG DES IN ABB.25 DARGESTELLTEN VERSUCHS. DIE BANDENDICHTE JADES TRANSKRIPTS IN JEDER PROBE WURDE NORMALISIERT GEGEN 18S-RNA UND ALS PROZENT DES NULLWERTES BERECHNET. JEDE SÄULE ENTSPRICHT DEM MEDIAN+/-SEM VON 4 EXPERIMENTEN. EXPRESSION DER RAR IN DER GASAMTPROSTATA = 100%. | 61 |
| ABB. 33: EXPRESSION VON RARS IN DER PROSTATA DER RATTE. IMMUNHISTOCHEMIE MIT ANTI RAR α . (1:200) | 62 |
| ABB. 34: EXPRESSION VON RARS IN DER PROSTATA DER RATTE. IMMUNHISTOCHEMIE MIT ANTI RAR γ . (1:200) | 63 |
| ABB. 35: KASTRATIONEFFEKT AUF DIE EXPRESSION VON RAR α -MRNA UND RAR γ -MRNA NACH VERSCHIEDENEN ZEITINTERVALLEN NACH KASTRATION IN DER PROSTATA DER RATTE. NORTHERN BLOTS MIT 15 µg POLY(A)-RNA AUS RATTEN-PROSTATEN UNBEHANDELT (KONTROLLE) UND NACH VERSCHIEDENEN ZEITINTERVALLEN NACH KASTRATION. NORMALISIERUNG GEGEN 18S-RNA. | 65 |
| ABB. 36: KASTRATIONEFFEKT AUF DIE EXPRESSION VON RAR β IN VENTRALER UND DORSALER PROSTATA DER RAT.TE (IMMUNHISTOCHEMIE MIT ANTI-RAR β ; 1:1000;)..... | 66 |
| ABB. 37: EXPRESSION VON RAR α MRNA IN LOBUND-WISTAR-RATTEN NACH BEHANDLUNG MIT MNU + TESTOSTERON IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT (IN WOCHEN) NACH BEHANDLUNGSBEGINN. | 67 |
| ABB. 38: EXPRESSION VON RAR γ MRNA IN LOBUND-WISTAR-RATTEN NACH BEHANDLUNG MIT MNU + TESTOSTERON IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT (IN WOCHEN) NACH BEHANDLUNGSBEGINN. | 68 |
| ABB. 39: UNTERSCHIEDE IN DER EXPRESSION VON RAR γ IN PROSTATAKARZINOM (LINKS) UND BPH (RECHTS) IN MENSCHLICHER PROSTATA. IMMUNHISTOCHEMIE MIT SEMIDÜNNSSCHNITTEN NACH RADIKALER PROSTATEKTOMIE WEGEN EINES GLEASON 6 PROSTATA-KARZINOMS..... | 69 |
| ABB. 40: IMMUNHISTOCHEMIE MIT ANTI-RAR γ -ANTIKÖRPERN. UNDIFFERENZIIERTES PROSTATAKARZINOM (GLEASON >7) LINKS IM BILD OHNE NACHWEIS VON IMMUNREAKTIVITÄT GEGEN RAR γ - RECHTS IM BILD: PIN MIT HETEROGENER ANFÄRBUNG EINES AZINUS. | 70 |
| ABB. 41: A) HEMATOXILIN-EOSIN-FÄRBUNG EINES UNDIFFERENZIIERTEN PROSTATAKARZINOMS. B) VERLUST DER IMMUNREAKTIVITÄT GEGEN RAR γ BEI EINEM UNDIFFERENZIIERTEN PROSTATAKARZINOM. | 71 |
| ABB. 42: UNTERSCHIEDE IN DER EXPRESSION VON RAR α -MRNA UND RAR γ -MRNA ZWISCHEN PROSTATA UND PROSTATA-KARZINOM . NORTHERN BLOTS MIT 15 µg POLY(A)-RNA AUS PROSTATA-GEWEBEN (HUMAN UND RATTE) UND DEN PROSTATA-ZELLINIEN NRP152, NRP154 UND LNCAP..... | 72 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| TAB. 1: PRIMER FÜR RT-PCR (SEQUENZEN, LOCI UND BASENPAARLÄNGE DER PCR-PRODUKTE) (NACH TANJI ET AL. 1996)..... | 28 |
| TAB. 2: PATIENTEN UND TUMORDATEN | 29 |
| TAB. 3: GRAD DER IMMUNREAKTIVITÄT (SEMI-QUANTITATIV) UND ANZAHL IMMUNPOSITIVER ZELLEN PRO AZINUS. VERGLEICH VON GEWEBSSCHNITTEN AUS MENSCHLICHEM PROSTATAGEWEBE ZWISCHEN BENIGNER PROSTATA (NORMAL); PIN, HOCHDIFFERENZIIERTEN (GLEASON <7) PROSTATAKARZINOMEN (LGPCA) UND UNDIFFERENZIIERTEN (GLEASON >6) PROSTATAKARZINOMEN (HGPCA). STATISTISCHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN GRUPPEN MIT $p < 0.05$ | 71 |

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Androgen und Vitamin A sind essentiell für die Aufrechterhaltung normaler Zellfunktionen in der Prostata. Androgen-Blockade resultiert in Prostata-Atrophie, hervorgerufen durch Apoptose und Inhibierung der Zellproliferation (Kyprianou and Isaacs, 1988; Lee et al. 1990). Andererseits sind Androgene an der Entstehung der Benigen Prostatahyperplasie beteiligt (Whitmore, 1973; Lee et al., 1995). Vitamin A – Mangel führt ebenfalls zur Prostata-Atrophie und ist durch Metaplasie von Prostata-Epithelzellen gekennzeichnet (Wolbach und Howe, 1925). Diese durch Vitamin A-Mangel hervorgerufenen Veränderungen können durch Gabe von Retinolsäure (RA) oder Retinol (ROH) verhindert werden (Thompson et al., 1964). Diese Daten und Arbeiten über die Prävention einer chemisch induzierten Prostata-Karzinogenese durch Retinolsäure (RA) und RA-Derivate, lassen vermuten, daß Retinoide eine kritische Rolle in der Aufrechterhaltung einer normalen Zelldifferenzierung von Prostataepithelzellen hat (Pollard et al., 1991; Pienta et al., 1993; Stearns et al., 1993).

Sowohl Androgene als auch Retinoide initiieren ihre biologische Aktivität durch Bindung und Aktivierung von Rezeptoren, die im Zellkern lokalisiert sind. Androgenrezeptor (AR) und Retinolsäurerezeptoren (RARs`), von denen eine Reihe von Untereinheiten beschrieben sind, ($RAR\alpha,\beta,\gamma$ und RXRs`) (Chambon et al., 1995) wurden als Liganden-induzierte Transkriptionsaktivatoren charakterisiert (Evans, 1988; Chambon, 1995). Das bedeutet, daß nach Bindung des Liganden (Androgen oder Retinoide) an den jeweiligen Rezeptor (AR, RARs`) dieser aktiviert wird und dadurch eine Kaskade verschiedener Reaktionen die Transkription von Genen veranlasst, deren Transkriptionsprodukte (Membranproteine, Enzyme) für Zellwachstum und Differenzierung verantwortlich sind. Eine Reihe von Beobachtungen lassen darauf schließen, daß Retinoide neben der Interaktion mit deren Retinoidrezeptoren, auch Einfluß auf die Expression des Androgenrezeptor (AR) nehmen (Peehl et al; Huang et al 1996 und 1997). Umgekehrt beeinflussen Androgene im Zellkulturmodell die Expression von RARs`. Dies ist besonders im Hinblick auf die Therapie des Prostatakarzinoms interessant, da bekanntermaßen das therapeutische Konzept einer Androgen-Eliminierung durch die Selektionierung androgenresistenter Prostatakarzinomzellen wirkungslos wird. Durch Einflußnahme auf die Expression des Androgenrezeptors mittels Retinoiden im Sinne einer Differenzierungs-Therapie, wie sie als Standard-Therapie bei der Promyelozyten-Leukämie eingesetzt wird, könnte diese Selektionierung möglicherweise verhindert werden.

2 STAND DER FORSCHUNG

Huang et al. fanden 1997, daß die mRNA-Transkripts der Retinolsäurerezeptoren RAR α und RAR γ vermehrt in Ratten-Prostaten vorkommen und daß die jeweiligen Gewebsspiegel dieser Transkripts durch Testosteron negativ moduliert werden. Im Gegensatz dazu fanden Huang et al. (1996) eine Dosis-abhängige Stimulation der RAR α - und RAR γ -mRNA in humanen LNCaP- Zellen nach Testosteronbehandlung.

Diese Daten lassen vermuten, daß RAR-gesteuerte Prozesse bei der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung bei Prostatakarzinomzellen involviert sind und daß dabei Interaktionen zwischen Androgenen und Retinoiden nicht nur mit deren jeweiligen Rezeptoren, sondern zwischen Androgenen und RARs`, sowie Retinoiden und dem Androgenrezeptor eine Rolle spielen.

Diese Beobachtungen sind vor allem im Hinblick auf die Karzinogenese des Prostatakarzinoms interessant, da unsere hier vorgestellten Daten sowohl im Tierexperiment als auch im humanen Prostatagewebe eine Veränderung der RAR-Rezeptor-Level auf mRNA-Ebene zeigen. Die Vermutung liegt nahe, daß Mechanismen der Zellregulation, die durch RAR- und AR-Aktivierung ablaufen, im Verlauf der Karzinogenese verändert werden.

Allgemein wird angenommen, daß Androgene bei der Karzinogenese des Prostatakarzinoms beteiligt sind, allerdings fehlt der Beweis eines direkt mitogenen Effekts von Androgenen auf Prostataepithelzellen. Eine Reihe von Untersuchungen lassen eher vermuten, daß Androgene Zellwachstum und Differenzierung durch Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren beeinflussen (McKeehan et al., 1984; Griffiths et al., 1993). Insbesondere die Expression von Epidermal growth factor (EGF) und dessen Rezeptor (EGF-R) kann durch Androgene reguliert werden (Traish and Wotiz, 1987; Schuurmans et al., 1988). Darüberhinaus wurde eine over-expression von EGF-R in BPH und beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom beschrieben (Turkeri and Wykes, 1994). Beobachtungen von Zhang and Goldsmith (1990) weisen darauf hin, daß die Expression von EGF-R durch RA moduliert werden kann. Somit liegt die Vermutung nahe, daß EGF/EGF-R –Interaktionen Mediatorfunktion bei der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung haben könnten und als mögliches Bindeglied bei der Signalvermittlung zwischen Androgenen und Retinoiden auf das Zellwachstum infrage kommen.

2.1 ANDROGENREZEPTOR – MOLEKULARBIOLOGIE, FUNKTION UND KLINISCHE BEDEUTUNG

Männliche Geschlechtshormone (Androgene) sind verantwortlich für die Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane, das Wachstum der Körperhaare, die Vergrößerung der Stimmbänder, die Spermatogenese, das Muskelwachstum und die Ausprägung anderer sekundärer Geschlechtsmerkmale. Jedes dieser Eigenschaften wird durch die gewebsspezifische Wechselwirkung von Androgenen mit dem im Zellkern von Targetzeellen lokalisierten Androgenrezeptor (AR) vermittelt, wodurch die Aktivierung oder Inhibierung von spezifischen Genen vermittelt wird (Kallio et al., 1996). Dabei ist relativ wenig über die Mechanismen durch die diese Gen-Aktivierung oder Supprimierung erfolgt bekannt. Anscheinend ist einer der ersten Schritte eine Interaktion zwischen dem Androgen-Androgenrezeptor-Komplex (A-AR) mit spezifischen DNA-Sequenzen in den Target-Zellen, den sogenannten Androgen-Responsive-Elements (AREs). Diese AREs enthalten Basensequenzen, die auch bei den Glucocorticoid-Responsive-Elements (GREs) und bei der Retinoic-Acid-Responsive Elements (RAREs) gefunden werden (Kallio et al, 1996; Chambon 1995; Mangelsdorf et al.1993). Diese Homologie der DNA-Sequenzen scheint bei der Aktivierung aller Steroid-Rezeptor-Hormon-Komplexen (Androgene, Glukortikoide, Retinoide) eine Rolle zu spielen.

Das Androgenrezeptor (AR)-Gen besteht aus 8 Exons von ~80kb Länge lokalisiert auf dem Chromosom Xq11-12 (Kallio et al.,1996). Zwei mRNAs (11 und 7.5kb) werden von dem AR-Gen transkribiert. Mehr als 200 Mutationen des AR-Gens wurden bisher beschrieben. Damit ist der AR der am meisten mutierte Transkriptionsfaktor, der bisher bekannt ist (Kallio et al; 1992). Dabei sind die meisten Mutationen Punktmutationen, die die Liganden-Bindung mit Androgenen beeinflussen.

Das AR-Protein ist polymorph aufgrund einer repetitiven Sequenz (CAG-repeat) am N-Terminal. Die Bedeutung dieses Längen-Polymorphismus ist unklar. Klinische Bedeutung scheint dieser Polymorphismus beim Kennedy-Syndrom, einer seltenen progressiven Motorneuron- Erkrankung zu haben, bei dem die Länge der CAG-Sequenzen direkt mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (LaSpada et al., 1992).

Neben dem Kennedy-Syndrom ist das Androgen Insensitivity Syndrome (AIS) mit Veränderungen am Androgenrezeptor verbunden, wobei hier bei einer Reihe von

Patienten keine Mutationen des AR-Gens nachgewiesen werden konnten (Quigley et al. 1995). Hinsichtlich der klinischen Relevanz des AR sind das Prostatakarzinom und das Mammakarzinom bedeutsam.

In mindestens zwei Publikationen (Wooster et al., 1992; Lobaccaro et al, 1993) wurden AR-Genmutationen im Mammakarzinom des Mannes beschrieben.

Die Progression des Prostatakarzinoms ist ein multifaktorieller Prozeß, bei dem eine Vielzahl genetischer Alterationen von Onkogenen, Tumor Supressor Genen und auch des AR-Gens beschrieben wurde. Die ersten Publikationen über AR-Genmutationen beim Prostatakarzinom stamen von Klocker et al. (1994). Offenbar scheint ein Zusammenhang zwischen der Progression des Prostatakarzinoms und der Inzidenz von AR-Rezeptormutationen zu bestehen, da AR-Mutationen wesentlich häufiger beim metastasierenden als beim primären Prostatakarzinom gefunden wurden (Taplin et al.; und Visakorpi et al. 1995).

2.2 RETINOIDREZEPTOREN UND RETINOIDE

Vitamin A ist eine essenzielle Komponente unserer Nahrung. Es ist seit langem bekannt, daß Retinoide (Derivate des Vitamin A) wesentlich sind für normales Wachstum, Sehkraft, Reproduktion und Regeneration einer Vielzahl von Geweben (Sporn et al. 1984; Wolbach and Howe, 1925). Andererseits ist bekannt, daß Vitamin A-Mangel ausgedehnte Metaplasien von Plattenzellepithelien im Respirationstrakt, Gastrointestinaltrakt, im Urintrakt und im Auge verursacht (Wolbach and Howe 1925; Underwood 1984). Darüberhinaus belegen Daten den Einfluß von Vitamin A auf die Embryogenese (Wilson et al. 1953). Eine komplette Eliminierung von Vitamin A verursacht im Tiermodell (VAD-Ratten) eine Vielzahl von kongenitalen Malformationen des Auges, des Aortenbogens, des Herzens, der Lunge und unter anderem die Agenesie von Prostata und Samenblase (Wilson et al. 1953). Ein exzessives Angebot von mütterlichem RA in der Embryogenese hat einen teratogenen Effekt (Kessel 1992). Die lokale Anwendung von Retinoiden auf die Organogenese der Extremitäten in Vertebraten und die Extremitäten-Regeneration als Folge einer lokalen Gabe von Retinoiden bei Amphibien belegen die Rolle von Retinoiden als Morphogene (Tabin, 1991).

Retinoide verursachen biologische Effekte durch Bindung mit Retinoidrezeptoren (Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987). Es wird angenommen, daß mindestens

zwei Gruppen von Retinoidrezeptoren existieren (Chambon, 1995). Retinoidrezeptoren gehören zu den Liganden-induzierbaren Transkriptionsfaktoren, zu denen auch Steroidhormon-Rezeptoren, Thyroidhormonrezeptoren und der Vitamin-D3-rezeptor gehören (Leid et al. 1992). Die Retinoidrezeptoren RAR $\alpha\beta\gamma$ werden sowohl durch all-*trans*-RA als auch 9-*cis*-RA aktiviert, wohingegen die Rezeptoren der RXR-Gruppe nur durch 9-*cis*-RA aktiviert wird (Leid et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1992). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der verschiedenen RARs und RXRs weisen einen hohen Grad an Homologie auf (Abb.1) (Chambon, 1995).

Der Mechanismus der RA/RAR- Interaktion ist schematisch in Abb.2 dargestellt. Es wird angenommen, daß sich der jeweilige RAR nach Bindung des Liganden (RA) an die Ligandenbindungsstelle, an spezifische DNA-Sequenzen (Retinoid Acid Responsive Elements =RAREs) anlagert und dadurch die Aktivierung von Target Genen verursacht (Chambon, 1995). Diese Target Gene kodieren Proteine, die für Zell-Proliferation und Differenzierung verantwortlich sind (Abb.2) (Chambon, 1995).

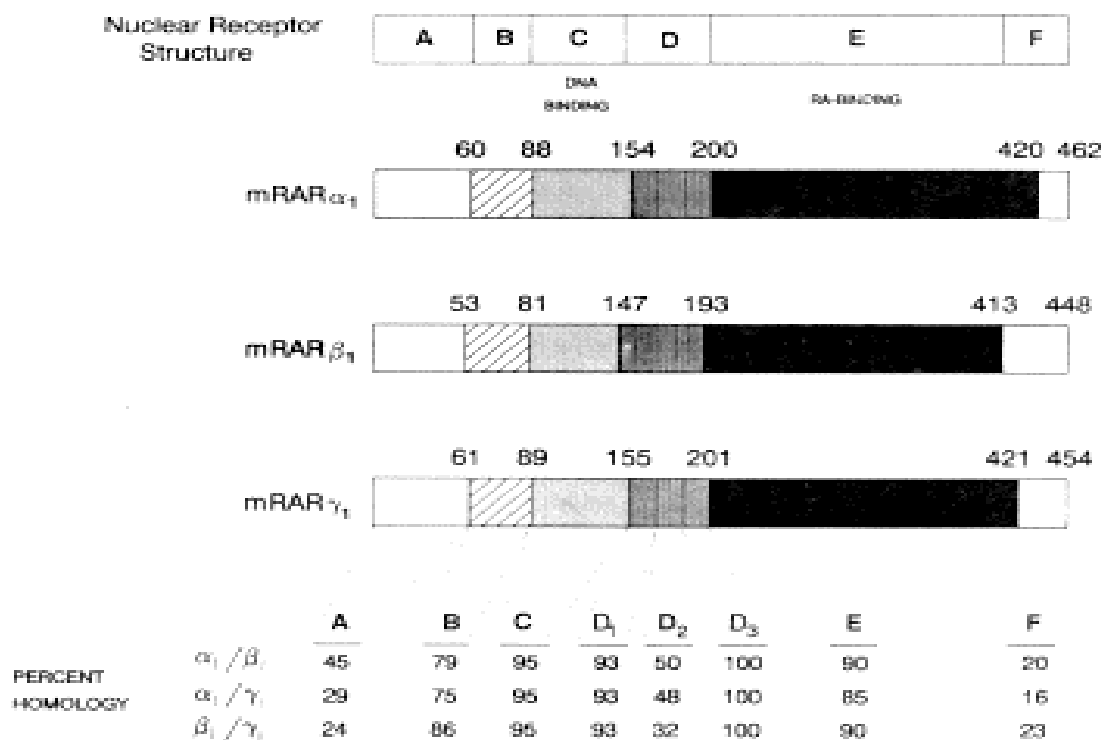


Abb. 1: Struktur der Retinoid-Rezeptoren RAR α,β,γ

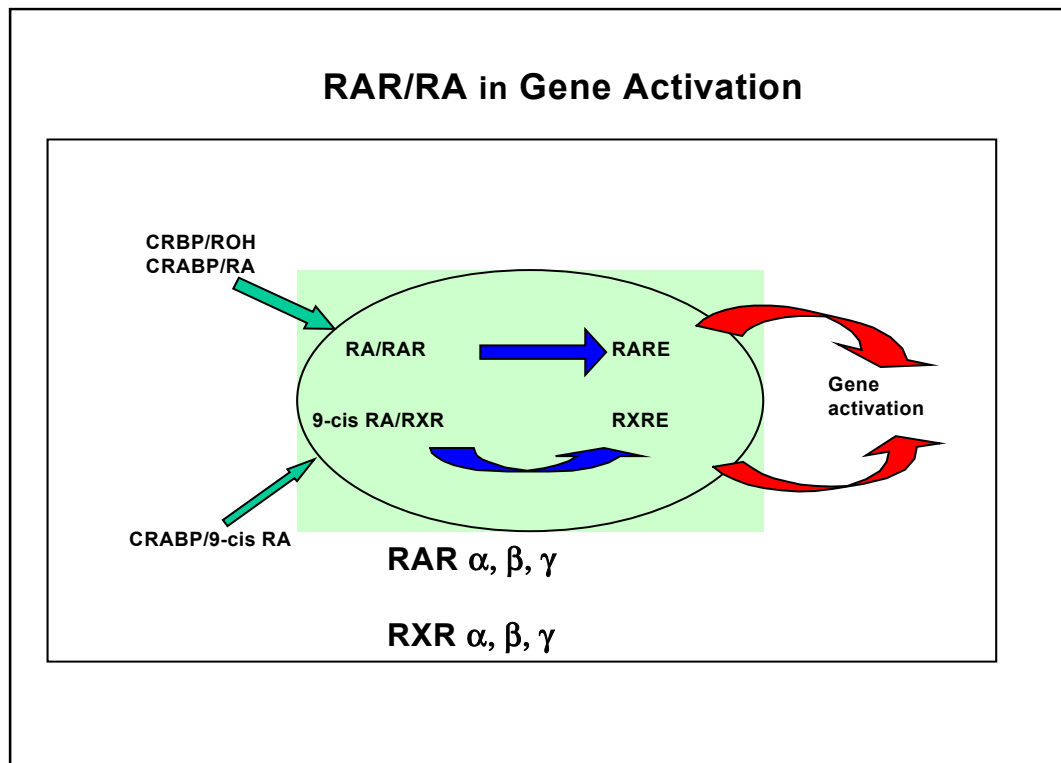


Abb. 2: Schematisierter Mechanismus der RA/RAR-Interaktion

2.3 ZELLKULTURMODELLE BEIM PROSTATAKARZINOM

Eine Vielzahl von Prostatakarzinomzelllinien ist derzeit in Laborversuchen im Einsatz. Dabei deutet die Zahl der verwendeten Zelllinien auf die Tatsache hin, daß keine einzelne Zelllinie alle Eigenschaften menschlicher Prostatakarzinomzellen hinreichend widerspiegeln. Neben der Eliminierung des Einflusses von Stroma-Epithel-Interaktionen, die beim menschlichen Prostatakarzinom eine Rolle spielen und auf die im Zellkulturmodell verzichtet werden muß, sind es vor allem Unterschiede hinsichtlich der Expression des Androgenrezeptores, die Unterschiede in der Zellbiologie verursachen. Dabei weisen die von uns verwendeten und eine Reihe anderer Zelllinien aufgrund von Mutationen des Androgenrezeptors Unterschiede hinsichtlich der Androgenabhängigkeit auf. Dabei werden Zellen unterschieden, die zum Wachstum Androgene benötigen (androgenabhängig), von solchen, die zur Proliferation zwar keine Androgene benötigen, jedoch durch Androgene im Wachstum stimulierbar sind (wie z.B. LNCaP-Zellen).

Eine dritte Gruppe von Prostatakarzinomzellen, zu denen PC3-Zellen gehören, sind im Wachstum komplett androgenunabhängig. Das bedeutet, daß diese Zellen zur Proliferation weder Androgene benötigen, noch durch diese stimuliert werden können.

Dabei sind die Unterschiede zwischen Prostatakarzinomzelllinien mit unterschiedlicher Androgenabhängigkeit nicht absolut. Interessante Arbeiten von Leland Cheung haben gezeigt, daß sich LNCaP-Zellen durch Subklonierung in eine aggressive Karzinom-Zelllinie, C2-4, transformieren lassen, die im Nacktmausmodell in der Lage ist, Knochenmetastasen zu verursachen (Cheung et al., 1997).

Die von uns in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellmodelle sind die folgenden:

LNCaP: Humane Epithelzelllinie aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines Patienten mit hormonresistentem, undifferenzierten metastasierendem Prostatakarzinom (**L**ymph **N**ode of **C**arcinoma of the **P**rostate), entwickelt 1981 durch Horoszewicz et al. (Cancer Research, 1983) in Roswell Park Memorial Institute. Die Zelllinie hat einen mutierten Androgenrezeptor und ist im Wachstum durch Androgene stimulierbar. LNCaP- Zellen exprimieren PSA, PAP und das Prostata-Spezifische Membran Antigen (PSMA). Der mutierte Androgen-Rezeptor in LNCaP-Zellen führt biologisch zu einer Stimulierung des Zellwachstums durch das Anti-Androgen Hydroxyflutamid.

PC3: Prostatakarzinomzelllinie mit aggressivem Wachstumsverhalten im Nacktmaus-Modell. Der Androgenrezeptor ist mutiert. Die Zelllinie ist komplett androgen-unabhängig hinsichtlich der Proliferation.

NRP152 : Prostataepithelzelllinie, entwickelt von Prostata aus Lobund-Wistar-Ratten. Keine Karzinomzelllinie (Danielpour et al, 1994). Die Proliferation der Prostata-Epithelzellen in Zellkultur wird durch die Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren (Hydrocortison, EGF, Cholera-Toxin) in das Zellmedium ermöglicht.

NRP154: Prostatakarzinomzelllinie, entwickelt von Prostata aus Lobund-Wistar-Ratten nach Induktion eines Prostatakarzinoms durch Gabe von Methyl-Nitrosoharnstoff (NMU) in die Schwanzvene, gefolgt von chronischer Gabe von Depot-Testosteron als S.C.Kapsel (Danielpour, et al., 1994).

Die menschlichen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 wurden wegen ihrer unterschiedlichen Androgenabhängigkeit verwendet.

Die Prostata-Epithel-Zelllinien NRP154 und NRP152, die aus Ratten-Prostaten gewonnen wurden erlauben einen direkten Vergleich der Retinoid/ Androgenwirkung auf normales und karzinomatös verändertes Prostata-Epithel und weiterhin eine Korrelation zu dem von uns verwendeten Tiermodell (Lobund-Wistar-Ratten).

2.4 TIERMODELLE DES PROSTATAKARZINOMS UND DEREN LIMITIERUNGEN

Die Karzinogenese des Prostatakarzinoms wird allgemein als “multi-step” Prozeß angesehen, der offenbar mit einer Progression von einer niedrig-gradigen Histologie über das latente Karzinom, bishin zum höher-gradigen metastasierenden Karzinom einhergeht. Es ist schwierig, einzelne Stadien dieser Progression zu untersuchen, doch erlauben einige Tiermodelle Aufschluß auf Teilprozesse der Karzinogenese des Prostatakarzinoms (Bosland, 1992). Die Anforderungen, die ein solches Karzinogenese-Modell erfüllen muß, um valide Schlußfolgerungen auf die Karzinogenese des humanen Prostatakarzinoms zuzulassen sind die folgenden:

- Übereinstimmung wesentlicher Elemente der Histologie, molekularer und genetischer Eigenschaften mit dem menschlichen Prostatakarzinom
- Übereinstimmung des biologischen Verhaltens mit dem menschlichen Prostatakarzinom (z.B. Androgen-Sensitivität, Fähigkeit zur Metastasierung)
- Praktikabilität (ausreichende Inzidenz der Karzinogenese in einem akzeptablen Zeitraum)
- Leider wird derzeit keines der verfügbaren Tiermodelle allen Anforderungen in idealer Weise gerecht (Buttayan und Slawin, 1993).

Die Induktion einer Karzinogenese im Rattenmodell durch einmalige Gabe eines chemischen Karzinogens erzielt nur eine geringe Inzidenz (5-25%) von Prostatakarzinomen in den so behandelten Tieren (Pollard, 1973; Bosland, 1992). Gleichmaßen wird durch chronische Gabe von Androgenen nur eine geringe Prostatakarzinom-Inzidenz erzielt. Die Kombination eines chemischen Karzinogens, wie Methyl-Nitroso-Harnstoff (MNU) mit der chronischen Gabe von Testosteron erzielt jedoch

Prostatakarzinome im Rattenmodell, deren Inzidenz bei 75-85% liegt (Pollard et al., 1991). Dabei wirkt Testosteron offenbar als Promoter.

Obwohl das Pollard-Modell in seiner Validität kritisiert wurde, haben immunhistochemische Untersuchungen belegt, daß die histologischen Veränderungen, die durch MNU und Depot-Testosteron in Lobund-Wistar-Ratten hervorgerufen wurden, in der Tat Prostata-Epithelzellen betreffen (Pugh et al., 1994).

Alle durch MNU oder Dimethyl-4-Aminobiphenyl (DMAB) induzierten Prostatakarzinome sind Adenokarzinome, die meist vom dorsolateralen und anterioren Lobus, aber nicht vom ventralen Lobus der Rattenprostaten ausgehen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Rattenprostata aus vier gepaarten Lappen besteht, die im Unterschied zur menschlichen Prostata nicht zu einem Organ zusammengefügt sind (Price, 1963).

Drei dieser Lappen - der dorsale, laterale und anteriore – weisen homologe Strukturen in der humanen Prostata auf. Der ventrale Lappen der Ratten-Prostata scheint kein menschliches Äquivalent zu haben (Price, 1963). Prostatakarzinome, die in Rattenprostaten erzeugt werden zeigen einige wesentliche Übereinstimmungen mit menschlichen Prostatakarzinomen, wie z.B. die Androgenabhängigkeit. Dennoch scheint Skelett-Metastasierung spezifisch für das menschliche Prostatakarzinom zu sein.

2.5 THERAPEUTISCHER EINSATZ VON RETINOIDEN BEI MALIGNEN TUMOREN

Retinoide, aufgrund ihrer biologischen Funktion als Morphogene, wurde experimentell bei Amphibien eingesetzt, wobei hierbei eine Regeneration der Extremitätenentwicklung erzielt werden konnte (Tabin et al, 1991). In Zuchtungsversuchen mit weiblichen Ratten, die mit Vitamin-A-Mangeldiät ernährt wurden (VAD- Ratten), wiesen die neugeborenen Ratten eine Vielzahl angeborener Mißbildungen auf. Unter anderem waren die Augen, der Urogenitaltrakt (mit Agenesie der Samenblasen und Prostata), der Aortenbogen, Herz und Lunge betroffen (Wald, 1968). Die meisten dieser Mißbildungen konnte durch Gabe von RA verhindert oder revertiert werden (Wilson et al., 1953; Van Pelt and de Roij, 1991).

Diese Untersuchungen veranlaßten den Einsatz von Retinoid-Derivaten (N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid = 4-HPR) im Tierversuch als mögliches Therapeutikum bei der Karzinogenese des Prostatakarzinoms (Pollard et al., 1991). Dabei konnten die Untersucher eine deutliche Reduzierung der Inzidenz von experimentell induzierten Prostatakarzinomen (von 88% auf 21%) nach Gabe des Retinoid-derivats während der Karzinogenese beobachten. Interessant war hierbei, daß mit der Gabe der 4-HPR-Diät relativ spät, 7 Monate nach Beginn der MNU/ Testosteron-Behandlung begonnen wurde. Die Autoren schlußfolgerten, daß der biologische Effekt des 4-HPR gegen die durch Testosteron hervorgerufene Promotion des Tumors zustande kommt.

Weitere Untersuchungen wurden mit dem Retinoid-Analog Fenretimid im Tiermodell durchgeführt (Pienta et al., 1993). Dabei wurde Fenretimid verwendet, um die Toxizität von RA zu vermeiden.

Diese Daten veranlaßten eine Reihe von klinischen Studien mit dem Ziel des Einsatzes von Retinoiden bei der Prävention des Prostatakarzinoms. Leider hat keine dieser klinischen Studien bisher Aufschluß über den Vorteil einer Retinoid-Gabe zur Karzinom-Prävention geliefert (Sporn et al., 1976; Reichmann et al., 1990; Lippmann et al., 1994).

Aufgrund der langen Latenzzeit bei der Karzinogenese des Prostatakarzinoms und der Vielfalt von Faktoren, die auf diese einwirken können, sind Ergebnisse in dieser Richtung auch in der näheren Zukunft nicht zu erwarten (Karp et al., 1996).

Ein überzeugendes Beispiel, wie Molekularbiologie direkten Einfluß auf Therapiekonzepte nehmen kann, wird am Beispiel der Akuten Promyelocyten-Leukämie, einer spezifischen Form der Akuten Myeloiden Leukämie, deutlich. Die Erkrankung geht mit einer spezifischen t(15;17)-Translokation der Blasten einher, die das PML-Gen am Chromosom 15, an das Gen des RAR α am Chromosom 17 fusioniert. Die Erkrankung ist biologisch durch eine Koagulopathie gekennzeichnet, die aufgrund von DIC und Fibrinolyse entsteht (Chomienne et al., 1996). Die Entdeckung, daß durch Gabe von all-trans-RA die Differenzierung unreifer Blasten in reifere Formen möglich ist, hat das therapeutische Herangehen bei dieser Erkrankung grundlegend verändert. Dieser Ansatz läßt auch bei anderen malignen Tumoren auf die Effizienz einer Differenzierungs-Therapie hoffen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 VERWENDETE ZELLINIEN UND DEREN CHARAKTERISIERUNG

LNCaP: Humane Epithelzelllinie aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines Patienten mit hormonresistentem, undifferenzierten metastasierendem Prostatakarzinom (Lymph Node of Carcinoma of the Prostate), entwickelt 1981 durch Horoszewicz et al. () in Roswell Park Memorial Institute. Die Zelllinie hat einen mutierten Androgenrezeptor und ist im Wachstum durch Androgene stimulierbar. Medium: RPMI mit 5% FCS bei 37 °C im Inkubator. Passage mittels 1% Trypsin/EDTA in RPMI bei 80-90% Konfluenz.

PC3: Androgenunabhängige Prostatakarzinomzelllinie mit aggressivem Wachstumsverhalten im Nacktmaus-Modell. Der Androgenrezeptor ist mutiert. Kultur: In RPMI-Medium mit 5% FCS bei 37 °C im Inkubator. Passage mittels 1% Trypsin/EDTA in RPMI bei 80-90% Konfluenz.

NRP152 : Prostataepithelzelllinie, entwickelt von Danielpour, Sporn et al. () von Prostaten aus Lobund-Wistar-Ratten. Wachstum in DMEM supplementiert mit 5% FCS, EGF, Cholera –Toxin, Hydrocortison bei 37 °C im Inkubator. Passage mittels 1% Trypsin/EDTA in DMEM bei 80-90% Konfluenz.

NRP154: Prostatakarzinomzelllinie, entwickelt von Danielpour, Sporn et al. () von Prostaten aus Lobund-Wistar-Ratten nach Induktion eines Prostatakarzinoms durch einmalige IV-Gabe von Methyl-nitrosoharnstoff (50mg/kg) in die Schwanzvene, gefolgt von Depot-Testosteron als S.C.-Kapsel. Wachstum in DMEM supplementiert mit 5% FCS, EGF, Cholera –Toxin, Hydrocortison bei 37 °C im Inkubator. Passage mittels 1% Trypsin/EDTA in DMEM bei 80-90% Konfluenz..

Die Zelllinien NRP154 und NRP152 erlauben einen direkten Vergleich der Retinoid/ Androgenwirkung auf normales und karzinomatös verändertes Prostata-Epithel.

3.2 TIERMODELL NACH POLLARD (LOBUND-WISTAR-RATTE)

Beobachtungen haben gezeigt, daß der Lobund-Wistar-Rattenstamm spontan zur Bildung von Prostatakarzinomen neigt (Pollard, 1973). Die Karzinogenese kann, wie Maurice Pollard, University of Indiana, in seinen Arbeiten gezeigt hat durch einmalige IV-Gabe von Methylnitrosoharnstoff (MNU, 50mg/kg) in die Schwanzvene gefolgt von subkutaner Verabreichung eines Testosteron-Depots stimuliert werden. 90% der so behandelten Tiere entwickelten nach 10-12 Monaten ein histologisch nachgewiesenes Prostatakarzinom. Insgesamt wurden 100 Lobund-Wistar –Ratten verwendet, die zum Zeitpunkt 0, 1.5 Monate, 3 Monate , 6 Monate und 12 Monate nach Behandlung mittels Diethylether euthanasiert wurden. Als Kontrollen dienten unbehandelte Tiere. Die Prostataen wurden disseziert und in dorsalen und ventralen Lappen getrennt. Ein Teil des Gewebes wurde in 10% Formaldehyd fixiert, paraffiniert und für Gewebsschnitte verwendet.

Mit diesen wurde nach De-paraffinierung immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen RAR α, β, γ durchgeführt. Der andere Teil des Gewebes wurde in Trockeneis schockgefroren und bis zur Verarbeitung in flüssigen Stickstoff bei -70° C gelagert.

Das schockgefrorene Gewebe wurde für die Isolierung von Gesamt- RNA zur RT-PCR verwendet.

3.3 GEWINNUNG VON HUMANEM PROSTATAGEWEBE- GEWEBEAUFBEREITUNG

Humanes Prostatagewebe wurde aus dem Urologischen Operationssaal des University Hospital, UMD-New Jersey Medical School, Newark, NJ, und dem Urologischen Operationssaal des VA-Hospitals, East Orange, NJ, USA, bezogen. In beiden Einrichtungen war zuvor durch die jeweilige Ethikkommission (Internal Revenue Board-IRB) die Verwendung von Prostatagewebe, das nicht zur pathologischen Diagnosestellung benötigt wurde, für Forschungszwecke befürwortet. Jeder Patient wurde vor dem Eingriff über die Absicht, Prostatagewebe für Forschungszwecke zu verwenden aufgeklärt. Eine Einverständniserklärung, die jeder Patient vor dem Eingriff zu

unterzeichnen hatte, war im Rahmen des Ethikantrages ausgearbeitet und von der Ethikkommission bestätigt worden. Von den Patienten, die wegen eines Prostatakarzinoms operiert wurden (Retropubische Radikale Prostatektomie) erhielt keiner Anti-Androgene präoperativ. Die Gewebesicherstellung erfolgte durch den Untersucher im Zusammenarbeit mit dem Pathologen, der durch Gewebsschnitte die Dignität des gewonnenen Gewebes nachwies.

Das Gewebe wurde dann auf Trockeneis schockgefroren und bis zur Verarbeitung in flüssigen Stickstoff bei -70°C gelagert. Einige Gewebeproben wurden direkt von der Nationalen Gewebebank (NIH, Bethesda, Maryland, USA) bezogen und dort charakterisiert. Die klinisch-pathologische Charakterisierung der verwendeten Gewebe hinsichtlich Tumor-Stadium, Gleason-Score und präoperativem PSA ist in Tab.2 angegeben. Keiner der Patienten hatte Behandlung mit Antiandrogenen oder LHRH-Agonisten.

3.4 BESTIMMUNG DER ZELLPROLIFERATION

- A) **Zellzählung** wurde durchgeführt, wobei die Anzahl der Zellen in einer $20\ \mu\text{l}$ Zellsuspension in den inneren 5×5 Feldern einer Neubauer-Kammer ausgezählt wurden. Die Gesamtzellzahl in der Zellkultur wurde berechnet.
- B) **$[^3\text{H}]$ -Thymidin- Inkorporation in die Zell-DNA** pro Zeiteinheit wurde als Marker der Zellproliferation verwendet. Dabei wurden die Zellen auf einer 12-well-Kulturplatte propagiert ($2\text{-}5 \times 10^4$ Zellen/ Well in 4 ml Medium). Nach 3 Tagen wurde das Medium entfernt und durch 1ml Kulturmedium (RPMI oder DMEM) mit cFCS ersetzt, um endogene Steroide im FCS zu eliminieren. Diesem Medium wurde $[^3\text{H}]$ -Thymidin in einer Konzentration von $0.5\ \mu\text{Ci/ml}$ der Zellkultur zugegeben. Die Zellen wurden nach vier Stunden mit 0.2ml Lyse-Puffer (0.1M NaCl , 0.01M EDTA , 0.3M Tris-HCl (pH8.0) mit 0.2M Sucrose und 0.5% SDS) lysiert. DNA wurde mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und durch Zugabe des gleichen Volmenanteils Isopropanol präzipitiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet mit Szintillationsflüssigkeit vermischt und die Aktivität proDNA im β -Counter bestimmt und als $\text{cpm}/\mu\text{g DNA}$ angegeben.

3.5 NORTHERN BLOTS MIT cDNA GEGEN ARmRNA und RARmRNA

Gesamt-RNA wurde von verschiedenen Geweben und Zelllinien wie bei Chomczynski und Sacchi beschrieben () isoliert. Gewebe wurden mit einem Polytron Homogenisator (Brinkmann Instruments, Westbury, NY) in 5 Vol. Denaturierungslösung (4M Guanidinthiozyanat; 25mM Natriumzitat pH7.0; 0.5% Sacrosyl und 0.1M 2-Mercaptoethanol) homogenisiert. Nach der Phenol- und Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurde die RNA aus der wässrigen Phase mit 1Vol. Isopropanol bei -20°C über Nacht präzipitiert und im Vakuum getrocknet. Poly(A)RNA wurde durch Oligo(Desoxythymidin)-Zellulose-Chromatografie isoliert, wie bei Chomczynski und Sacchi () beschrieben. Die Poly(A)RNA wurde mittels Elektrophorese eines 1% Formaldehyd-17% Agarose-Gels separiert und auf eine Biotrans-Membran (ICN Biomedical, Costa Mesa, CA). Die komplementären cDNA-Abschnitte von Maus- $\text{RAR}\alpha, \beta, \gamma$ wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese nach Endonuklease-Digestion isoliert und mit $[^{32}\text{P}]$ -Desoxy-CTP markiert (Random priming kit, Boehringer, Mannheim). Die Blots wurden für 2-4 Stunden in 6 x SSC (150mM NaCl und 15mM Natriumzitat, pH7.0), 0.5% SDS, 50% Formamid und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierte Sperm-DNA bei 42°C prähybridisiert.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in der gleichen Lösung unter Zusatz von 10^6 cpm/ml radiomarkierter cDNA. Die Membranen wurden dann in 1 x SSC (+0.1% SDS) bei 68°C für 20-30 min gewaschen. Weitere Wasch-Schritte unter Wechsel des Waschpuffers (0.2 x SSC und 0.1% SDS) bei 68°C für 2 – 4 Stunden. Für die autoradiographische Signaldetektion wurde ein KODAK XAR-5-Film (Eastman, Kodak, Rochester, USA) mit Intensivierungsschirm für 2-10 Tage mit der Membran bei -20°C belichtet. Die Membranen wurden nach filmentwicklung gestrippt und mit $[^{32}\text{P}]$ -markierter β -Aktin-cDNA und/ oder cDNA gegen 18SrRNA rehybridisiert.

Die Signalintensität wurde durch Densitometrie unter Verwendung eines SHIMADZU-Densitometers und Integrators (Shimadzu Scientific Instruments, Princeton, NJ, USA) bestimmt.

3.6 ANALYSE DER GEN-EXPRESSION MIT GEN-ARRAYS (NRP152 und NRP154)

Unterschiede in der Gen-Expression zwischen den Zelllinien NRP152 und NRP154 wurden unter Verwendung des AtlasTM cDNA-Expressions Arrays (CLONTECH) analysiert. Dabei kann mittels AtlasTM-1.2-Array die Expression von 1176 Genen untersucht werden, die für eine Vielzahl bekannter Onkogene, Tumor Suppressor Gene, Zell-Zyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Transportproteine, Zellmembranrezeptoren und Wachstumsfaktoren kodieren. Dabei wurde von den Zelllinien NRP152 und NRP154 Gesamt-RNA, wie oben beschrieben isoliert, mit ³²P markiert und mit dem AtlasTM-1.2-Array für 12 Stunden hybridisiert. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte dann mittels der vom Hersteller (CLONTECH) gelieferten Phospho-Imaging-Software (AtlasImageTM 1.0).

3.7 RT-PCR MIT RAR α,β,γ - PRIMERN

Da die Menge an humanem Prostatagewebe begrenzt war, wurde RT-PCR für die Identifizierung der RARmRNAs verwendet. Einzelstrang-cDNA wurde unter Verwendung von 4 µg RNA und random hexamer primers (Life Technologies) mit Reverser Transcriptase (RT) von Moloney Maus-Leukämie-Virus synthetisiert. Die PCR-Reaktion wurde mit den in Tab. 1 angegebenen sense und anti-sense Primer-Sequenzen für RAR α,β,γ durchgeführt (Tanji et al., 1996). Eine Zyklus-Response-Kurve wurde für jedes Primer-Paar durchgeführt, um sicherzustellen, daß die Amplifikationsbedingungen in den linearen Bereich der Zklus-Response-Kurve fallen. Die Bedingungen für jede Reaktion im Thermocycler (PERKIN-ELMERS) waren: 30 Zyklen mit folgenden Reaktionsbedingungen pro Zyklus: 94⁰ C für 45 sec., 55⁰ C für 30 sec., 72⁰ C für 90 sec. Die Amplifikation wurde beendet bei 72⁰C für 10 Minuten. Jede Reaktionsmischung von 50µl Gesamtvolumen enthielt: 2µl RT-Produkt, 10 µM dNTP, 1.5 µM MgCl₂ und 0.5 Units Taq-Polymerase in 10 X PCR-Puffer (Life Technologies).

Eine Mischung von Kontroll-Primern mit und ohne Reverser Transkriptase wurde eingesetzt um die Effizienz der RT-Reaktion nachzuweisen (SUPERSSCRIPT®, LIFE TECHNOLOGIES). Eine Reaktionsmischung mit Kontroll-Primern für G6PDH wurde eingesetzt um gleiche Bedingungen bei der Gel-Beladung, sowie die Effizienz der PCR-Reaktion zu demonstrieren

Tab. 1: Primer für RT-PCR (Sequenzen, Loci und Basenpaarlänge der PCR-Produkte)
(nach Tanji et al. 1996)

| Primer | Orientation | Sequence | Location | Product size (bp) |
|--------------|-------------|-----------------------|-------------|----------------------|
| RAR α | sense | GACTGTTTGCCTGCTCTTCT | 529 - 1075 | 547 |
| | antisense | GGGTGCCTCTTTCTTCTTTT | | |
| RAR β | sense | CCGAGGCAGGAGGGTCTA | 2108 - 2509 | 327 |
| | antisense | CGTAGGCTGTTGGTCTTTTT | | |
| RAR γ | sense | CTCTCCCTCACCCCCACCA | 543 - 1056 | 514 |
| | antisense | CCGCTTCGCAAACCTCCACAA | | |

Tab. 2: Patienten und Tumordaten

| Patient | Pca Stage | PSA preop. | Glieson -Score | Operation | Alter [Jahre] |
|---------|-----------------|---------------|-------------------|----------------------|------------------|
| B.B. | D2 | 79.8 | 8 | TURP | 77 |
| L.W. | T1a | 4.8 | 6 | RP+BPLND | 65 |
| V.M. | T1a | 5.8 | 5 | RP+BPLND | 67 |
| P.A. | T1a | 7.1 | 6 | RP+BPLND | 64 |
| M.L. | T2a | 4.7 | 5 | PLND+RP | 61 |
| D.G. | D2 | 95.3 | 8 | TURP | 76 |
| D.J. | T2a | 6.6 | 5 | RP+BPLND | 63 |
| M.J. | D1 | 12.8 | 8 | TURP | 72 |
| B.R. | T2b | 7.9 | 6 | PLND+RP | 62 |
| D.I. | T1a | 1.3 | 6 | PLND+RP | 61 |
| R.L. | Benigne | 2.0 | | | 61 |
| V.A. | Benigne | 1.1 | | | 59 |
| F.A. | Benigne | 1.5 | | | 55 |
| L.W. | Benigne | 0.5 | | | 61 |
| W.J. | Blasenkarzinom | 2.1 | | Radikale Zystektomie | 70 |
| K.J. | Bladderhemangio | 3.2 | | Radikale Zystektomie | 72 |
| V.N. | Benigne | 1.07 | | | 66 |
| J.G. | Benigne | | | | 65 |
| G.L. | Benigne | 3.3 | | TURP | 71 |
| W.A. | Benigne | 1.1 | | | 67 |
| T.G. | Blasenkarzinom | 1.5 | | Radikale Zystektomie | 61 |
| F.R. | Blasenkarzinom | 3.1 | | Radikale Zystektomie | 70 |

TURP = Transurethrale Prostataresektion; PLND = Pelvine Lymphadenektomie; RP = Radikale Prostatektomie

3.8 WESTERN BLOTS MIT ANTIKÖRPERN GEGEN RAR α , RAR β , RAR γ , und EGFR

Zellen in einer 25ml-Kulturflasche wurden in PBS gewaschen und in 1ml Protein-Lyse-Puffer (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1% TritonX, 1 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin (pH8.0) lysiert und als 0.1ml Aliquote bei -70°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Protein Assay ([PIERCE@](#)) entsprechend der Angaben des Herstellers gegen eine Verdünnungskurve von Rinder-Serum-Albumin (BSA-Standard, 2mg/ml Protein) bei 562nm spektrophotometrisch bestimmt. Für die Durchführung der Western Blots wurden 15 μ l Probe (=20 μ g Protein) mit dem gleichen Volumen an 2X Loading-Puffer vermischt (1X= 125mM Tris-HCl, pH6.8 mit 2% SDS, 5% Glycerol, 0.003% Bromphenylblau und 1% 1-Mercaptoethanol) und im Wasserbad für 5 Minuten gekocht. Die Probemischung wurde dann durch Elektrophorese für 1.5 Stunde bei 150V auf einem 7.5% SDS-PAGE-Minigel (BIORAD[®]) getrennt. Danach wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (BIORAD[®]) bei 45V für 4 Stunden transferiert.

Die Membran wurde mittels TBST –Puffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween, pH8.0) unter Zugabe von 3% bei 4°C über Nacht geblockt.

Danach wurde die Membran mit TBST gewaschen und mit dem jeweiligen primären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei waren die Verdünnungen bei den verschiedenen Antikörpern wie folgt:

Anti-RAR α -Ab, Anti-RAR β -Ab und Anti-RAR γ -Ab 1: 1000 in TBST.

Nach wiederholtem Waschen in TBST für 30 min. unter wiederholtem Wechseln des Waschpuffers wurden die Membranen mit Anti-IgG/Peroxidase-Konjugat (1:1000 in TBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in TBST für 45 Minuten erfolgte die Signal-Detektion durch Luminol-Luciferase (ECL-PLUS, AMERSHAM[®]) und Belichtung eines Kodak-XOMAT Films.

3.9 LIGANDEN-BINDUNGS-ASSAYS MIT [¹²⁵I]-EGF und [¹²⁵I]-IGF1

3.9.1 Zellmembran- Präparation

Membranfraktionen von Zellen wurden nach der von Wang et al. (1989) beschriebenen Methode isoliert. Dabei wurden die Zell-Pellets in 3 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (2.5mM Tris-HCl, 0.3M Sucrose und 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Aprotinin , 10µg/ml und Leupeptin 1µg/ml; pH 7.4) homogenisiert.

Die Homogenate wurden für 3 x 30 sec. bei 90% Gesamtintensität Ultraschall ausgesetzt (Fisher Sonic Dismembrator Model 300) und danach für 15 min. bei 600 x g bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 1/3 Volmen eines Puffers versetzt, der 0.4M NaCl, 0.8mM MgSO₄, Aprotinin , 10µg/ml und Leupeptin 1µg/ml; pH 7.4 enthielt. Die Membranen wurden dann durch Zentrifugation bei 40,000 x g für eine Stunde in der Ultrazentrifuge (BECKMAN, Ti40-Rotor) als Pellet sedimentiert. Die Pellets wurden in Phosphat-Puffer (15mM NaH₂PO₄, 80mM Na₂HPO₄ Aprotinin , 10µg/ml und Leupeptin 1µg/ml; pH 7.4) resuspendiert und in Aliquoten bei -70°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Protein Assay ([PIERCE@](#)) entsprechend der Angaben des Herstellers gegen eine Verdünnungskurve von Rinder-Serum-Albumin (BSA-Standard, 2mg/ml Protein) bei 562nm spektrophotometrisch bestimmt.

3.9.2 Liganden-Bindungs-Assays

Duplikate der oben beschriebenen Membranpräparationen entsprechend 0.1 mg Protein wurden mit steigenden Konzentrationen von ¹²⁵I-markiertem EGF (0-1000 nM) oder ¹²⁵I-markiertem IGF1 (0-1000nM) in 0.2 ml Reaktionspuffer (5mM Tris-HCl, pH 7.0, 125mM Sucrose, 75mM NaCl, 0.5mM CaCl₂ und 0.5% BSA) für 60 min. bei 25°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1ml eiskaltem Waschpuffer (5mM Tris-HCl und 0.5% BSA, pH 7.0) gestoppt. Membrangebndenes [¹²⁵I]-EGF oder [¹²⁵I]-IGF1 durch 4 min. Zentrifugation bei 14,000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) bei 4°C präzipitiert. Die Pellets wurden danach in 1ml Waschpuffer resuspendiert.

Die Intensität des γ -Emissionssignals im γ -Counter diente zur Quantifizierung des membrangebundenen [125 I]-Isotops. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung entsprechend der Signalintensität in Gegenwart eines 100fachen Überschusses an unmarkiertem EGF oder IGF1, von der totalen Bindung errechnet. Die Resultate wurden in fmol/ mg Protein ausgedrückt. Ein Scatchard-Plot erlaubte die Bestimmung der Art der Bindungskinetik.

3.10 IMMUNHISTOCHEMIE MIT ANTIKÖRPERN GEGEN RAR α , RAR β , RAR γ und EGFR

Zellen: Zellen wurden auf Zellkulturgläser aufgetragen und propagiert. Nachdem 75-80% Konfluenz erzielt war, wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd in PBS (plus 0.1% Triton für intrazelluläre Antigene) für 20 min. bei 4°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden in PBS gewaschen und mit 1.5% H₂O₂ für 10 min. bei Raumtemperatur behandelt, um den Effekt unspezifischer Peroxidasen zu eliminieren. Die Zellen wurden dann für 30 min. mit 4% Serum in PBS/Triton (0.01%) geblockt und anschließend mit PBS (2 x 5 min.) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (polyklonal, Santa Cruz Biotech; Verdünnungen: 1:200 in 4% Serum/PBS unter Zusatz von 0.01% Triton) über Nacht (12 Stunden) in einer geschlossenen und befeuchteten Kammer. Danach wurden die fixierten Zellen mit PBS gewaschen (2x5min) und mit Biotin-markiertem Anti-Kaninchen-IgG (Sigma, 1:200 in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Nach erneutem Waschen mit PBS (2x5 min) wurde Vectastain-Lösung A+B zugesetzt. Die immunhistochemische Erkennungsreaktion war eine Streptavidin-Biotin-Reaktion mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Vectastain Elite ABC®) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Farbdetektion erfolgte durch Zugabe einer frisch zubereiteten 0.06%igen Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)-Lösung (Research genetics). Die Beurteilung der Immunfärbung erfolgte im Mikroskop mittels Vergleich mit positiven und negativen Kontrollen. Nach Waschen der Zellen in PBS erfolgte Gegenfärbung mit Hematoxylin und anschließend 0.1% Ammoniumhydrochlorid. Bei allen Versuchen wurden parallel negative Kontrollen durchgeführt, bei denen anstelle des primären Antikörpers Serum verwendet wurde.

Gewebsschnitte: Die Schnitte wurden in Xylen deparaffiniert und in einer alkoholischen Verdünnungsreihe fallender Konzentration (100-0%) hydriert. Danach wurden die Schnitte in 0.01M Natriumzitrat (pH 6.0) für 30 min. im Wasserbad gekocht und anschließend in

PBS (2x5min) gewaschen. Die weitere immunhistochemische Aufarbeitung der Gewebsschnitte folgte dann im Wesentlichen dem oben angegebenen Protokoll.

3.11 DATENANALYSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Das primär verwendete statistische Modell war eine Ein-Weg -Varianzanalyse (ANOVA) um Unterschiede zwischen Gruppen zu unterscheiden. Die Daten wurden hinsichtlich Normalverteilung mittels SHAPIRO-WILK-W-Test untersucht. Die angewandten Kriterien zur

Unterscheidung zwischen signifikanten Unterschieden innerhalb der zu vergleichenden Gruppen wurde im Paarvergleich mittels Students`-T-Test ($p < 0.01$) durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor wurde der WILCOXON-Test als nicht-parametrischer Test durchgeführt, um Unterschiede innerhalb der Vergleichsgruppen nachzuweisen. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des JMP-Software Pakets ausgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Bestimmung der Zellproliferation

A) NRP154 und NRP152-Zellen

Abb. 3: zeigt die Wachstumskurve von NRP-152 und NRP-154 in DMEM-Medium mit 10%FCS. Die Anzahl der NRP-152 und NRP-154-Zellen nahm im Zeitraum von 5-6 Tagen stetig zu, ohne daß das Zellmedium gewechselt werden mußte. In diesem Zeitraum nahm die Anzahl der NRP-152-Zellen auf das 15fache des Ausgangswertes zu, die Anzahl der NRP154-Zellen nahm im gleichen Zeitraum auf das 60fache des Ausgangswertes zu ($p < 0.001$). Danach nahm die Anzahl der NRP-152-Zellen weiterhin zu, währenddessen die Anzahl der NRP-154-Zellen abnahm.

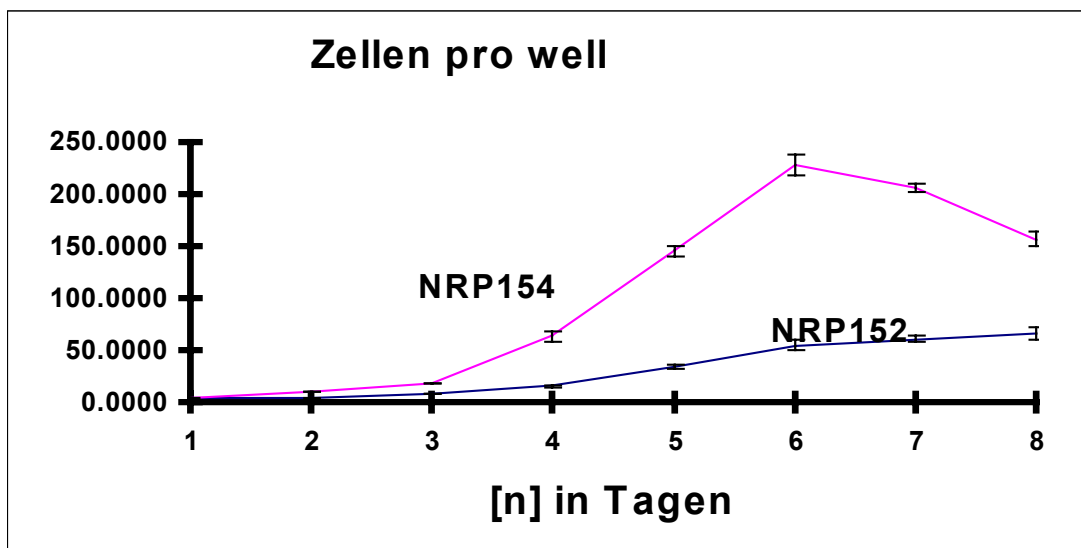


Abb. 3: Zellproliferation von NRP152 und NRP154 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Jeder Punkt entspricht dem Median \pm -SEM von 4 Experimenten.

Behandlung von NRP-152-Zellen mit RA in DMEM-Medium (mit 10% cFCS) für 4 Tage resultierte in einer dosisabhängigen Zunahme der Zellzahl, mit einem maximalen proliferativen Effekt bei einer RA-Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$; Abb. 2A). Dabei nahm die Zellproliferation im angegebenen Zeitraum nach Behandlung mit $0.1 \mu\text{M}$ RA auf das fast 5fache des Ausgangswertes (unbehandelte Zellen zum Vergleich) an.

Behandlung von NRP-154-Zellen mit RA resultierte demgegenüber nicht in einer signifikanten Zunahme der Zellzahl ($p < 0.01$; Abb. 4:).

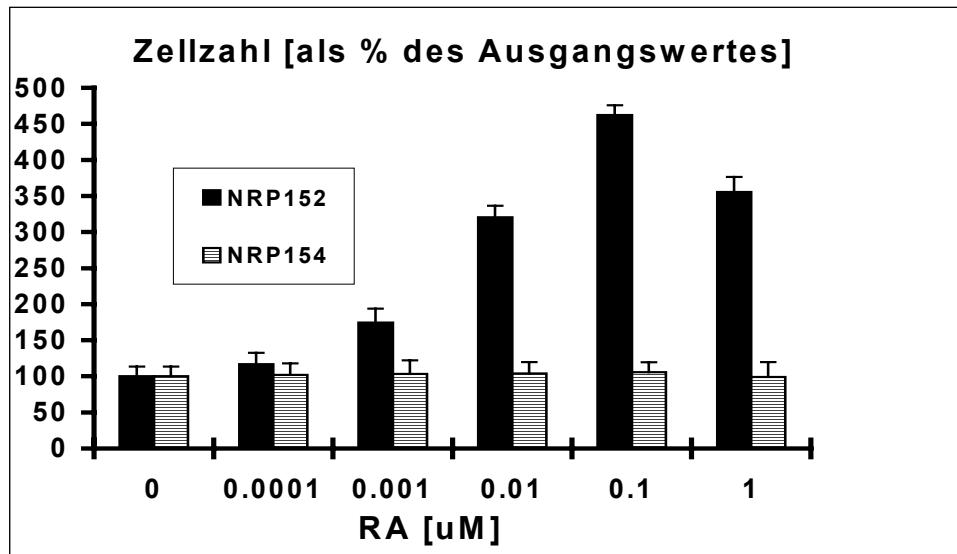


Abb. 4: Abhängigkeit der Zellproliferation bei NRP152 und NRP154 von der RA-Konzentration
Jede Säule entspricht dem Median \pm SEM von 4 Experimenten.

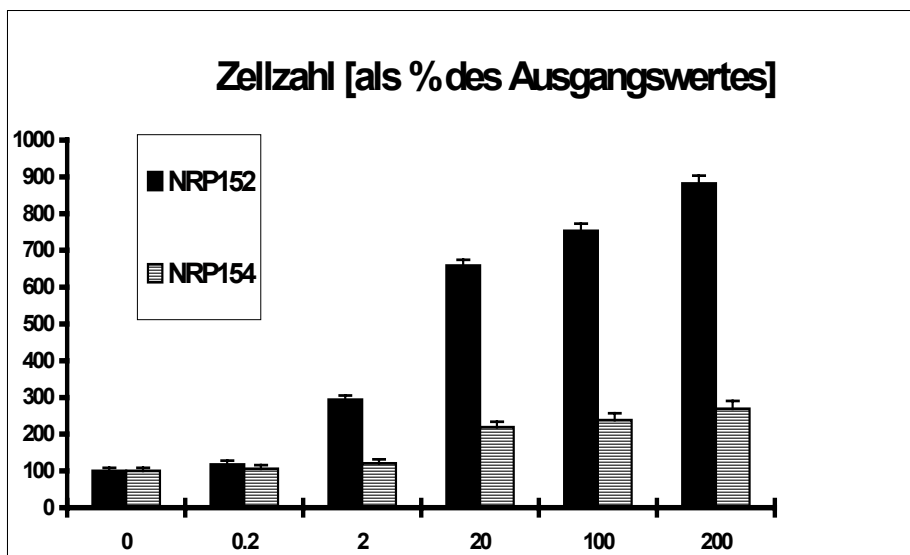


Abb. 5: Abhängigkeit der Zellproliferation bei NRP152 und NRP154 von der Testosteron-Konzentration. Jede Säule entspricht dem Median \pm SEM von 4 Experimenten.

Unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen verursachte Behandlung mit Testosteron (T) bei beiden Zelllinien (NRP-152 und NRP-154) eine dosisabhängige Stimulation der Zellproliferation ($p < 0.01$; Abb. 5:). Dabei erhöhte sich die Zahl der NRP-152- Zellen im Dosis-Bereich von 0 – 0.2 μM T um mehr als das 8fache des Ausgangswertes (T=0, unbehandelte Zellen zum Vergleich). Die Proliferation der NRP-154-Zellen erhöhte sich nur um das 2.5fache im Vergleich zu unbehandelten NRP-154-Zellen ($p < 0.01$).

B) LNCaP-Zellen

Bein LNCaP-Zellen verursachte eine Testosteronbehandlung eine dosisabhängige Stimulation der Zellproliferation ($p < 0.01$;

Abb. 6:). Dabei erhöhte sich die Zahl der LNCaP- Zellen im Dosis-Bereich von 0 – 0.2 μM T um mehr als das 3fache des Ausgangswertes (T=0, Unbehandelte Zellen im Vergleich). Behandlung von LNCaP-Zellen mit RA verursachte eine Dosis-abhängige Stimulation der Zellproliferation bis zu einer RA-Konzentration von 0.1 μM (Abb. 7:). Hierbei nahm die Zellzahl auf das 4fache des Ausgangswertes zu (unbehandelte Zellen im Vergleich).

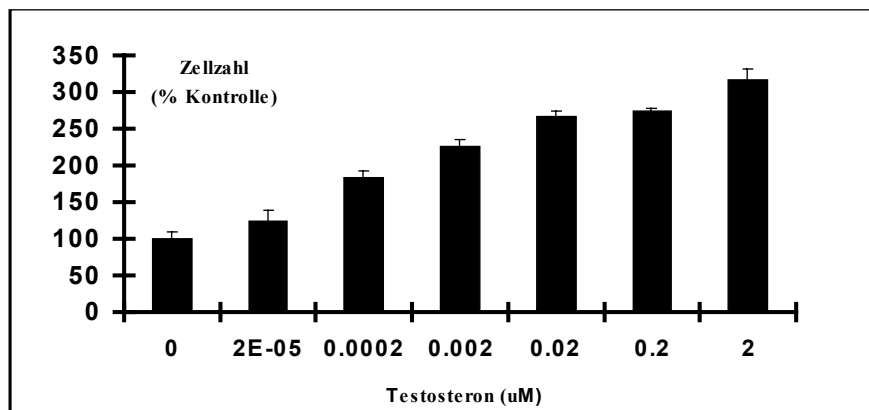


Abb. 6: Abhängigkeit der Zellproliferation bei LNCaP-Zellen von der Testosteron-Konzentration

Jede Säule entspricht dem Median \pm SEM von 4 Experimenten.

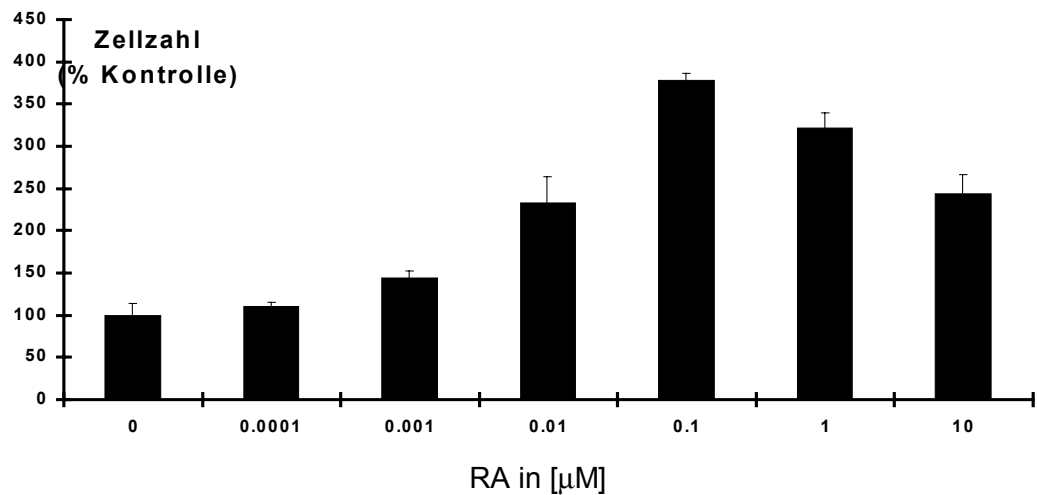


Abb. 7: Abhängigkeit der Zellproliferation bei LNCaP-Zellen von der RA-Konzentration. Jede Säule entspricht dem Median+/-SEM von 4 Experimenten.

C) PC3- Zellen

Bei PC3- Zellen, die mit Testosteron (0 – 20nM) behandelt wurden, ließen sich erwartungsgemäß im Wachstum nicht beeinflussen (Abb. 8:).

Ebenso ließ sich die Zellproliferationsrate von PC3-Zellen durch Gabe von RA (0- 10μM) nicht beeinflussen (Abb. 9:).

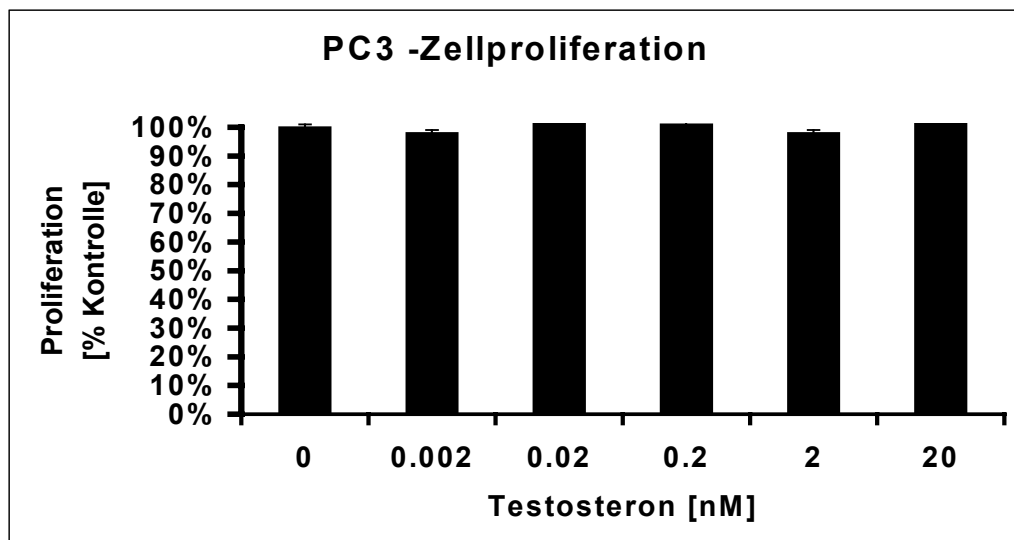


Abb. 8: Abhängigkeit der Zellproliferation bei PC3-Zellen von der Testosteron-Konzentration
Jede Säule entspricht dem Median+/-SEM von 4 Experimenten.

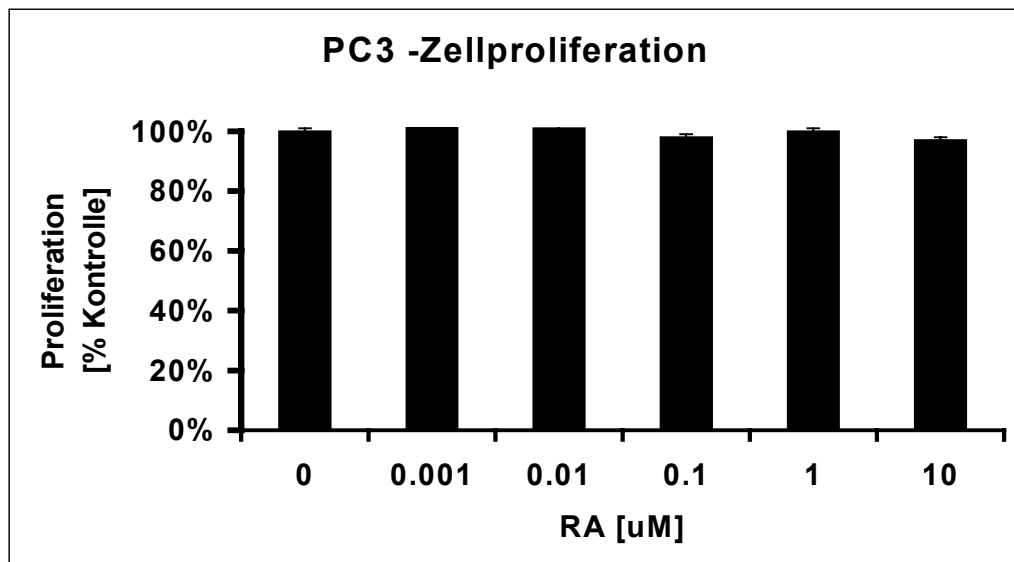


Abb. 9: Abhängigkeit der Zellproliferation bei LNCaP-Zellen von der RA-Konzentration. Jede Säule entspricht dem Median \pm SEM von 4 Experimenten.

4.2 AR-mRNA und RAR-mRNA- Expression

Northern Blots mit isolierter Poly (A)RNA von den Zelllinien NRP152 und NRP154 konnten die 9.4kb – Bande der Androgenrezeptor (AR)mRNA nachweisen. Beide Zelllinien wurden in DMEM mit 10%FCS kultiviert. Die Bandendichte der ARmRNA war 5fach höher in NRP152, im Vergleich zu NRP154 bei gleicher Menge an Poly(A)RNA (25 μ g von beiden Zelllinien) (

Abb. 10:A). A.bb. 10B zeigt, die Bandendichte der 3.4 und 2.7kb RAR α mRNA ist 2.5 fach höher in NRP-154-Zellen bei gleicher Menge an Poly(A)RNA (25 μ g von beiden Zelllinien; n=3; p<0.05). Die Bandendichte der 3.4 kb RAR γ mRNA war demgegenüber 25% niedriger in NRP154-Zellen, im Vergleich zu NRP-152.

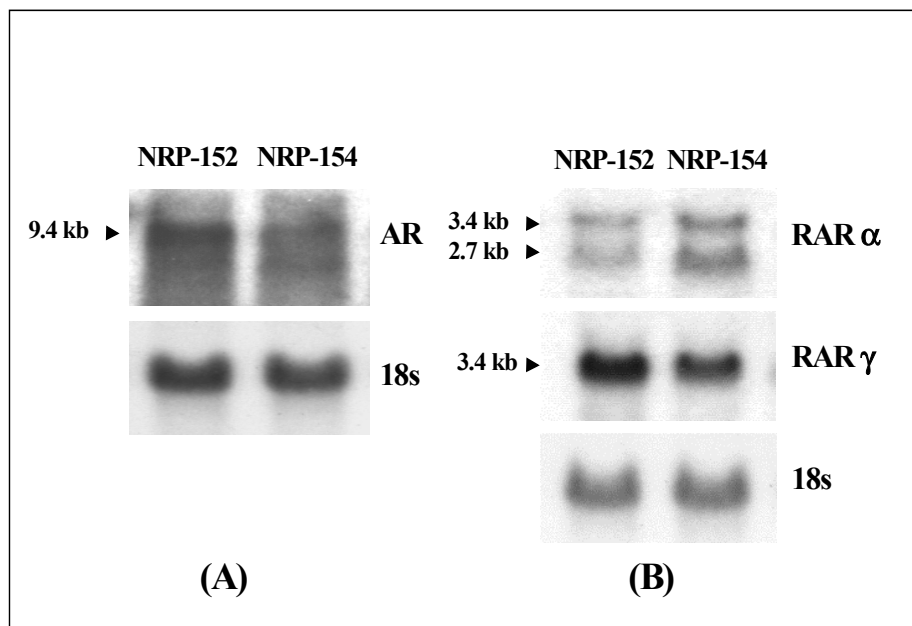


Abb. 10: (A) Vergleich der Expression der Androgenrezeptor (AR)-mRNA und der RAR zwischen NRP152 und NRP154. (B) Vergleich der Expression der RAR α - und RAR γ -mRNA zwischen NRP154 und NRP152. RAR γ up-reguliert in NRP152. RAR α up-reguliert in NRP154

Behandlung von NRP-152-Zellen mit T für 6 Stunden resultierte in einer biphasischen, dosisabhängigen Reduzierung der RAR α -mRNA und der RAR γ -mRNA, mit der niedrigsten RARmRNA-Expression bei 0.002-0.02 μ M Testosteron (T) ($p < 0.01$; Abb.11). Im Gegensatz dazu, zeigte die Dosis-Wirkungs-Kurve der Testosteronbehandlung auf die Expression von RAR α -mRNA und RAR γ -mRNA bei NRP154 einen genau entgegengesetzten Verlauf, m einem Anstieg der Expression von RAR α -mRNA und RAR γ -mRNA bis zum Maximum bei einer Testosteron-Konzenttion von 0.01 μ M(Abb. 11:).

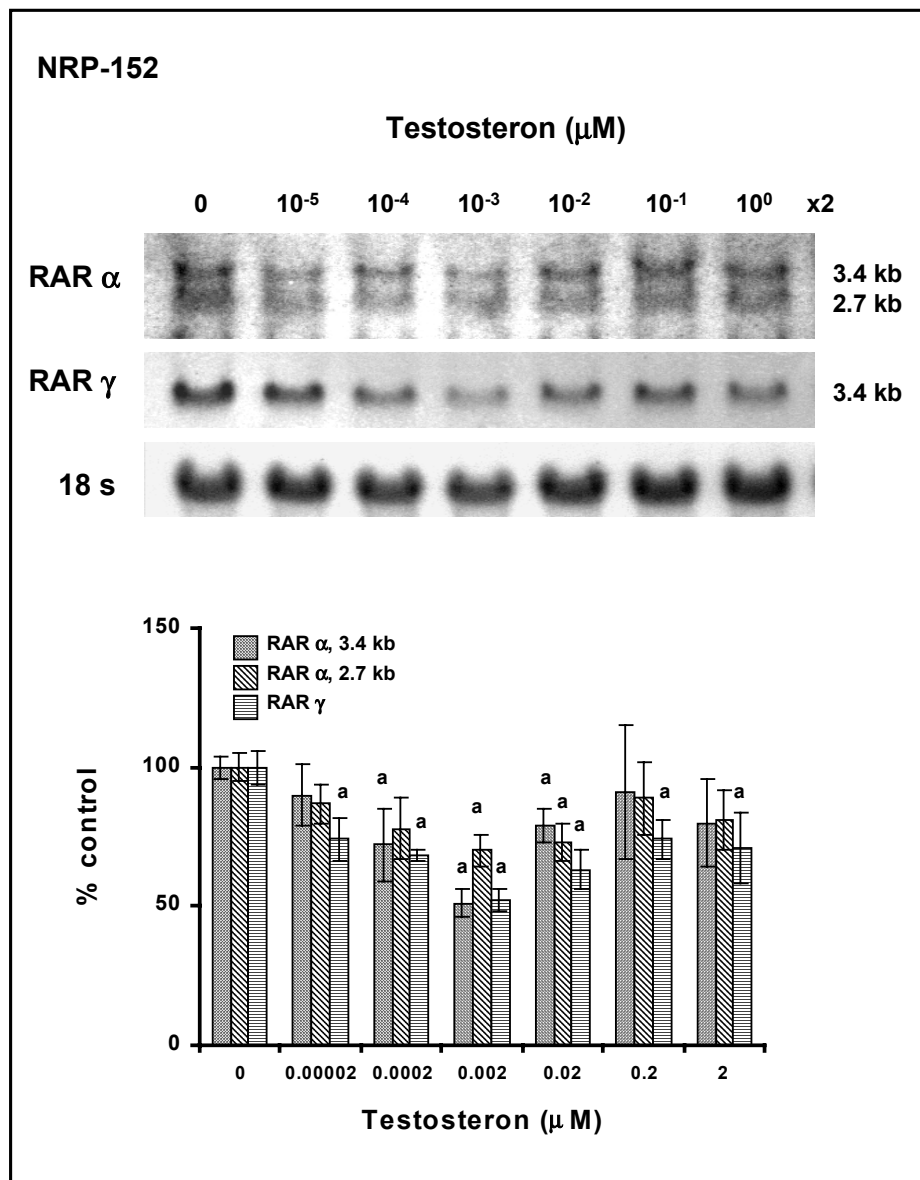


Abb. 11: Expression von RAR α und RAR γ -mRNA in NRP152 in Abhängigkeit von der Testosteron-Konzentration. Repräsentative Northern-Blots (oberes Bild) und quantitative Analyse des Dosis-Effekts von Testosteron auf die Expression von RAR α und RAR γ -mRNA nach 6 Stunden Behandlung. Jede Bande wurde durch Hybridisierung von 15 μg Poly(A)-RNA isoliert von der NRP152-Zellsuspension gewonnen. Detektion durch [^{53}P]-markierte cDNA für RAR α und RAR γ (Prof. P. Chambon, Strassbourg). Die Bandendichte jedes Transkripts in jeder Probe wurde normalisiert gegen 18S-RNA und als Prozent des Nullwertes (unbehandelte Proben = 100%) berechnet. Jede Säule entspricht dem Median \pm SEM von 4 Experimenten. a: Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, $P < 0.05$.

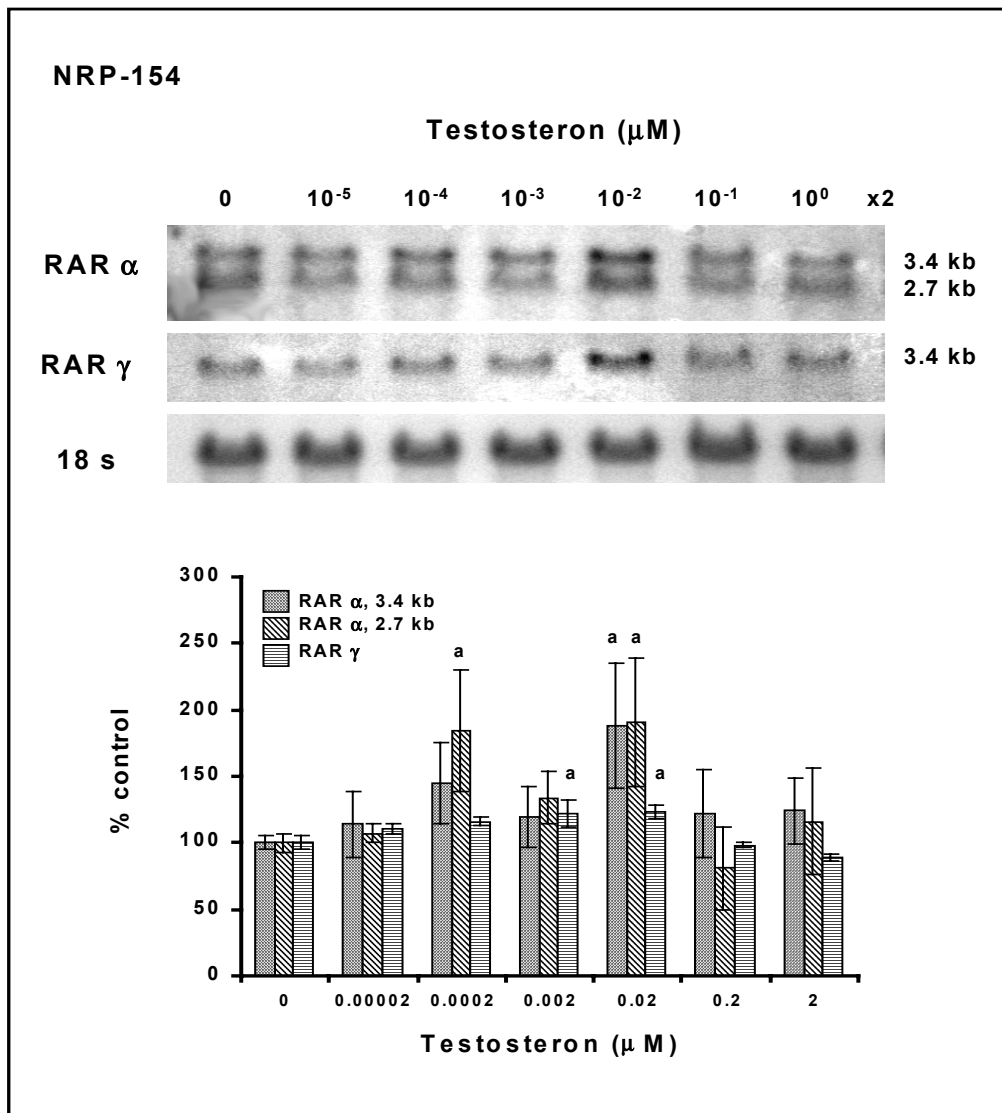


Abb. 12: Expression von RAR α und RAR γ -mRNA in NRP154 in Abhängigkeit von der Testosteron-Konzentration. Repräsentative Northern-Blots (oberes Bild) und quantitative Analyse des Dosis-Effekts von Testosteron auf die Expression von RAR α und RAR γ -mRNA nach 6 Stunden Behandlung. Jede Bande wurde durch Hybridisierung von 15 μg Poly(A)-RNA isoliert von der NRP152-Zellsuspension gewonnen. Detektion durch [^{53}P]-markierte cDNA für RAR α und RAR γ (Prof.P.Chambon, Strassbourg). Die Bandendichte jedes Transkripts in jeder Probe wurde normalisiert gegen 18S-RNA und als Prozent des Nullwertes (unbehandelte Proben =100%) berechnet. Jede Säule entspricht dem Median \pm -SEM von 4 Experimenten. a: Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, $P<0.05$.

Die Expression von RAR α -mRNA in LNCaP-Zellen war durch Testosteron bis zu einer Konzentration von 20nM Up-regulierbar. Die Expression von RAR γ -mRNA wurde durch Testosteron im Dosisbereich von 0-20 μ M down-reguliert (Abb. 13).

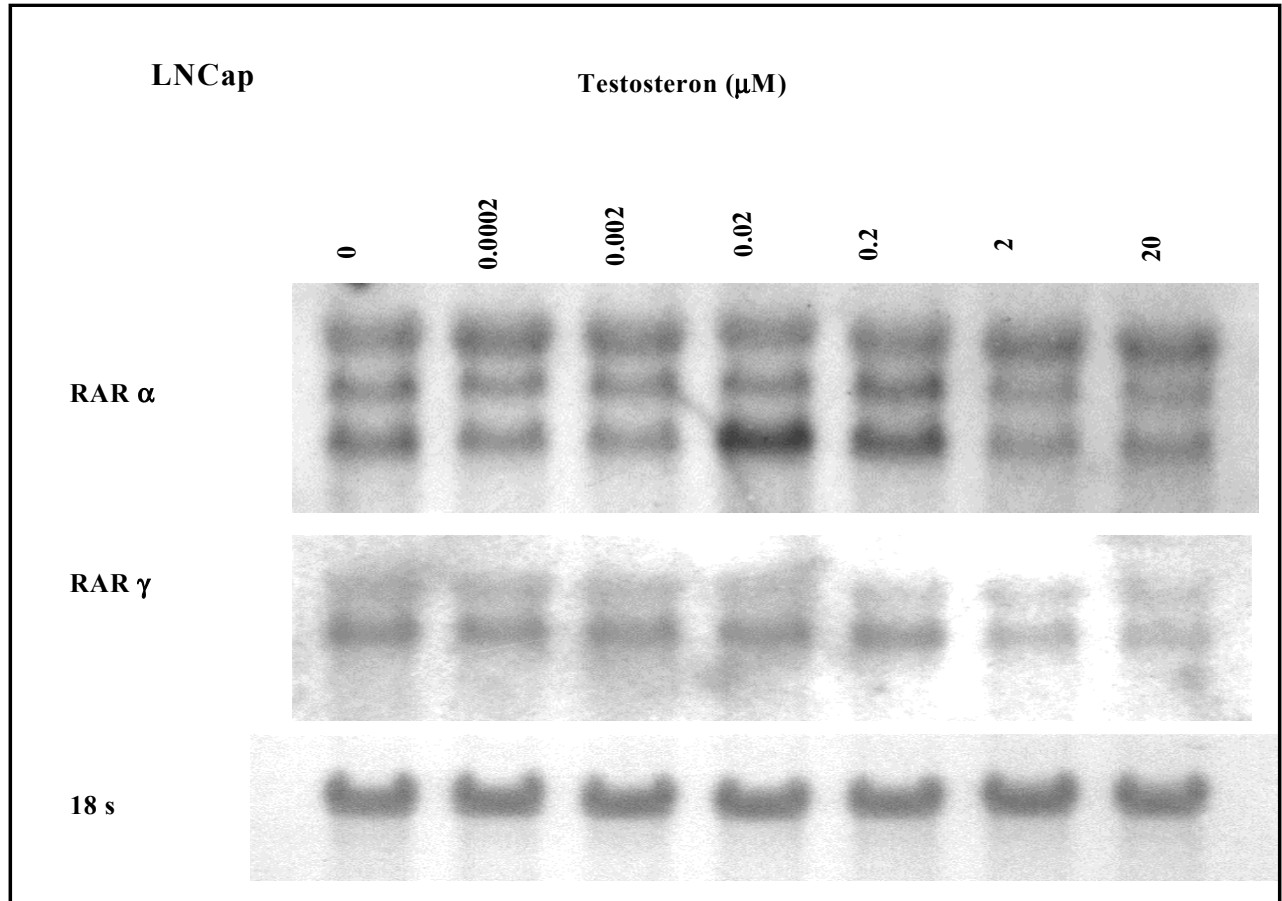


Abb. 13: Expression von RAR α und RAR γ -mRNA in LNCaP-Zellen in Abhängigkeit von der Testosteron-Konzentration. Repräsentative Northern-Blots demonstrieren die Expression von RAR α - und RAR γ -mRNA nach 6 Stunden Behandlung. Jede Bande wurde durch Hybridisierung von 15 μ g Poly(A)-RNA isoliert von der LNCaP-Zellsuspension gewonnen. Detektion durch [53 P]-markierte cDNA für RAR α und RAR γ (Prof.P.Chambon, Strassbourg). Die Bandendichte jedes Transkripts in jeder Probe wurde normalisiert gegen 18S-RNA und als Prozent des Nullwertes (unbehandelte Proben =100%) berechnet.

4.3 Gen-Arrays zur Identifizierung unterschiedlicher Genexpression zwischen NRP152 und NRP154

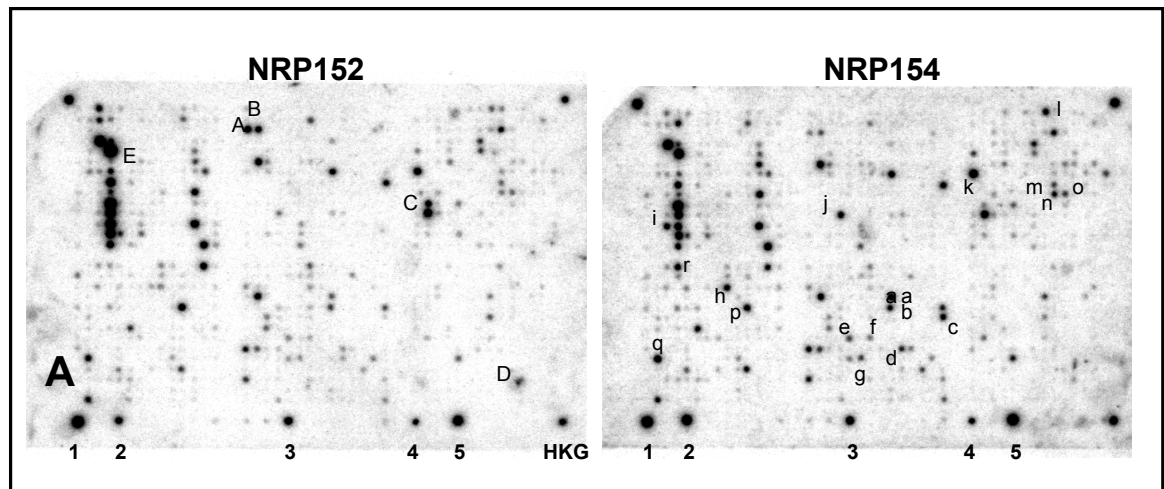


Abb. 14: Macro- Gen-Array (Clontech) um Unterschiede der Expression verschiedener Gene zwischen NRP152 und NRP154 aufzufinden. A-E waren up-reguliert in NRP152. a-l waren up-reguliert in NRP154.

Gene a – r sind up-reguliert in NRP154 Zellen

a: Calcium/ calmodulin-dependent protein kinase type IV, b: cell adhesion kinase beta (CAKbdt), c: Rab-4a ras-related protein, d: MRK; serine/threonine kinase, e: Leptin precursor, f: PKR; double-stranded RNA-activated eIF-2a kinase, g: Beta arrestin 1, h: GABA-B receptor 1a and 1b, i: T-lymphocyte maturation-associated protein, j: Glycerol kinase; glycerokinase, k: Syntaxin binding protein, l: Cytochrome P-450 4F5, m: 67kDa glutamic acid decarboxylase, n: glutamic acid decarboxylase, o: aldehydogenase 2, p: opioid receptor-like orphan receptor, q: somatostatin receptor 1, r: calcitonin receptor precursor

Gene A – E are up-reguliert in NRP152 Zellen

A: cytochrome P450VII; cholesterol 7-alpha-hydroxylase, B: glucose transporter type 1, C: testis fructose-6-phosphate 2-kinase; fructose-2,6-biphosphatase, D: Cak tyrosine-protein kinase, E: Urokinase receptor + GPI-anchored form urokinase plasminogen activator surface receptor House keeping -Gene (HKG)

HKG 1: myosin, HKG 2: beta actin, HKG 3: GAPDH, HKG 4: phospholipase A2 precursor, HKG 5: polyubiquitin

4.4 Einfluß der Androgenbehandlung auf Expression von Onkogenen – Unterschiede zwischen NRP152/NRP154

Northern Blot-Hybridisierung mit c-myc-cDNA unter Verwendung von Poly(A)-RNA, die von NRP-152 und NRP-154 nach Testosteronbehandlung mit 20nM T nach unterschiedlichen Zeitintervallen nach Behandlungsbeginn isoliert wurde ergab, daß sich die Expression von c-myc-mRNA in NRP-152 durch Testosteronbehandlung nicht veränderte. Dabei waren weder bei der Dosis-Wirkungs-Kurve im Dosierungsintervall von 0 – 200nM T (nicht dargestellt), noch im zeitlichen Verlauf (20nM T) statistisch signifikante Änderungen der c-myc-mRNA-Expression nachweisbar (Abb. 15).

Demgegenüber war die Expression der c-myc-mRNA in NRP154-Zellen durch Testosteron stimulierbar. Dabei wurde in der Dosis-Wirkungs-Kurve (nicht dargestellt), die maximale c-myc-mRNA-Expression bei 20 nM T nachgewiesen. Im zeitlichen Verlauf war die Stimulierung durch Testosteron 15 Minuten nach Behandlung erkennbar, und bis 180 Minuten nach Behandlungsbeginn nachweisbar (Abb. 15).

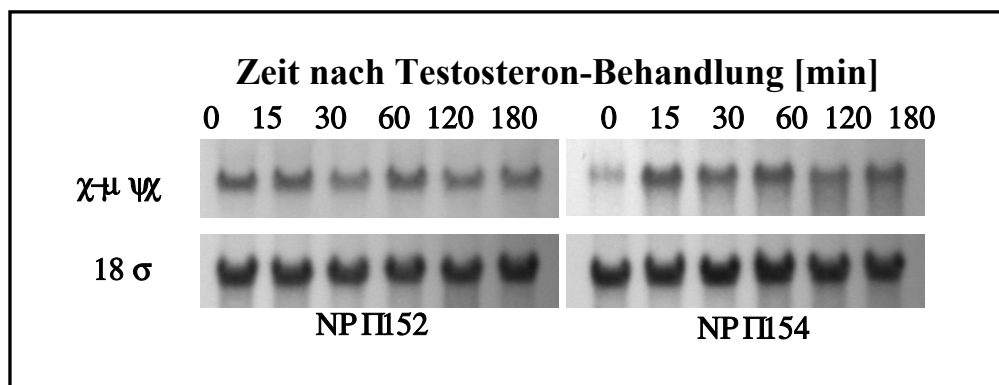


Abb. 15: Expression von Onkogenen c-myc-mRNA wird durch Androgene stimuliert. In NRP152 erfolgte keine Änderung der c-myc-mRNA-Expression nach Gabe von Testosteron. In NRP154 wurde die Expression von c-myc-mRNA durch Androgenbehandlung stimuliert. Der Effekt war 15 Minuten nach Behandlungsbeginn nachweisbar, und dauerte bis 3 Stunden nach Behandlung an.

Die Tatsache, daß Prostatakarzinomzellen durch Androgene zur Expression von Onkogenen veranlaßt werden können, erklärt möglicherweise die klinisch nachweisbare Stimulierbarkeit des Prostatakarzinoms durch Testosteron. Diese Daten sind andererseits Hinweis darauf, daß unser Zellmodell wesentliche Eigenschaften von klinischen Prostatakarzinomen widerspiegelt.

4.5 RT-PCR von menschlichem Prostatagewebe (Benigne versus Karzinom) mit RAR-Primern

RAR α : Ein Vergleich der Bandendichten der 547bp-RT-PCR-Produkte von RNA aus humanem Prostatagewebe nach Gelelektrophorese (2% Agarose) unter Verwendung der in Tab. 2 angegebenen Primer, zeigte signifikante Unterschiede für die Expression der RAR α mRNA-Transkripts im Vergleich zwischen benignen (25 Proben) und malignen Prostatagewebe (25 Proben). Die mittlere Bandendichte bei den Prostatakarzinomen war 46.6 +/- 10.3% gegenüber 13.4 +/- 5.8% bei benignen Prostatageweben (Abb.13; $p < 0.01$). Von den 25 benignen Gewebeproben zeigten 15 keine Expression von RAR α mRNA. Die klinische Charakterisierung der verwendeten Gewebe hinsichtlich Tumor-Stadium, Gleason-Score und präoperativem PSA ist in Tab. 1 angegeben. Keiner der Patienten hatte Behandlung mit Antiandrogenen oder LHRH-Agonisten.

RAR β : Ein Vergleich der mittleren Bandendichten der 327bp-RT-PCR-Produkte unter Verwendung der in Tab. 2 angegebenen Primer zeigte mit 25.2 +/- 8.9% (25 benigne) gegenüber 20.3 +/- 5.5% (25 maligne) keine signifikanten Unterschiede (Abb.14 ; $p < 0.01$).

RAR γ : Ein Vergleich der mittleren Bandenintensitäten der 514bp-RT-PCR-Produkte nach 2% Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung der in Tab.2 angegebenen Primer zeigte mit 78.5 +/- 3.5% (25 benigne) gegenüber 10.9 +/- 4.6% (25 maligne) signifikante Unterschiede (Abb. 15 ; $p < 0.01$). Von den 25 malignen Gewebeproben zeigten 15 keine Expression von RAR γ mRNA.

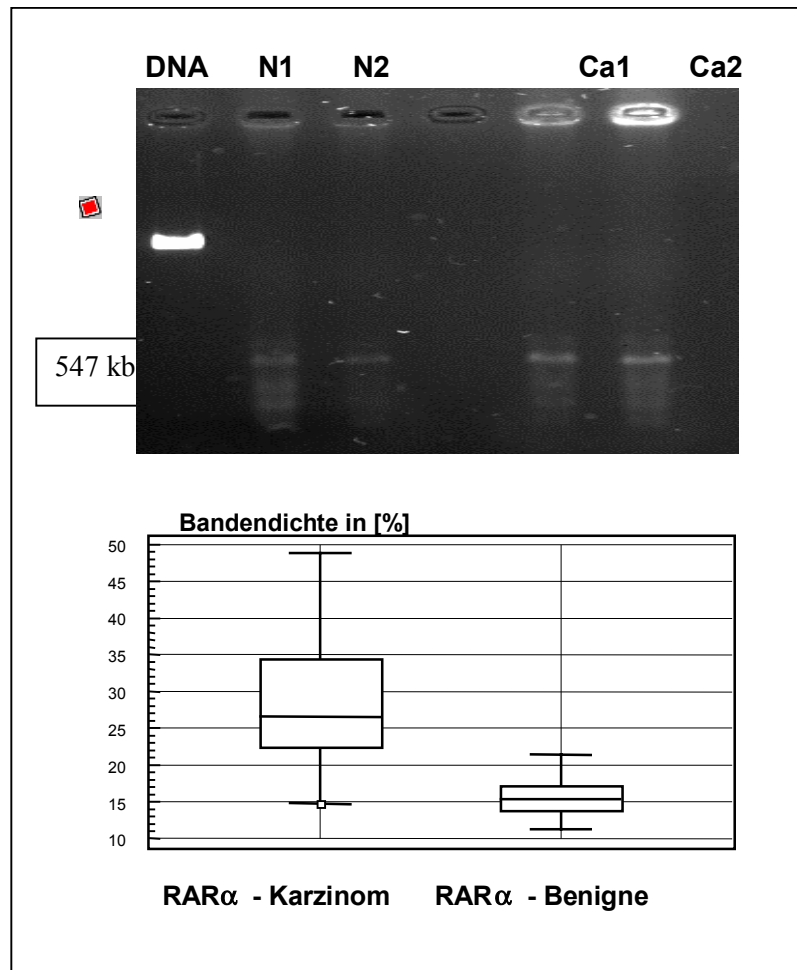


Abb. 16: RT-PCR mit RNA von humanem Prostatagewebe. Vergleich der Expression von RAR α -RNA zwischen benignem [n=25] und malignem [n=25] Prostatagewebe. Primer und RT-PCR-Produkte wie in Tab. 1 angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen Karzinom und benigner Prostata ($n < 0.05$).

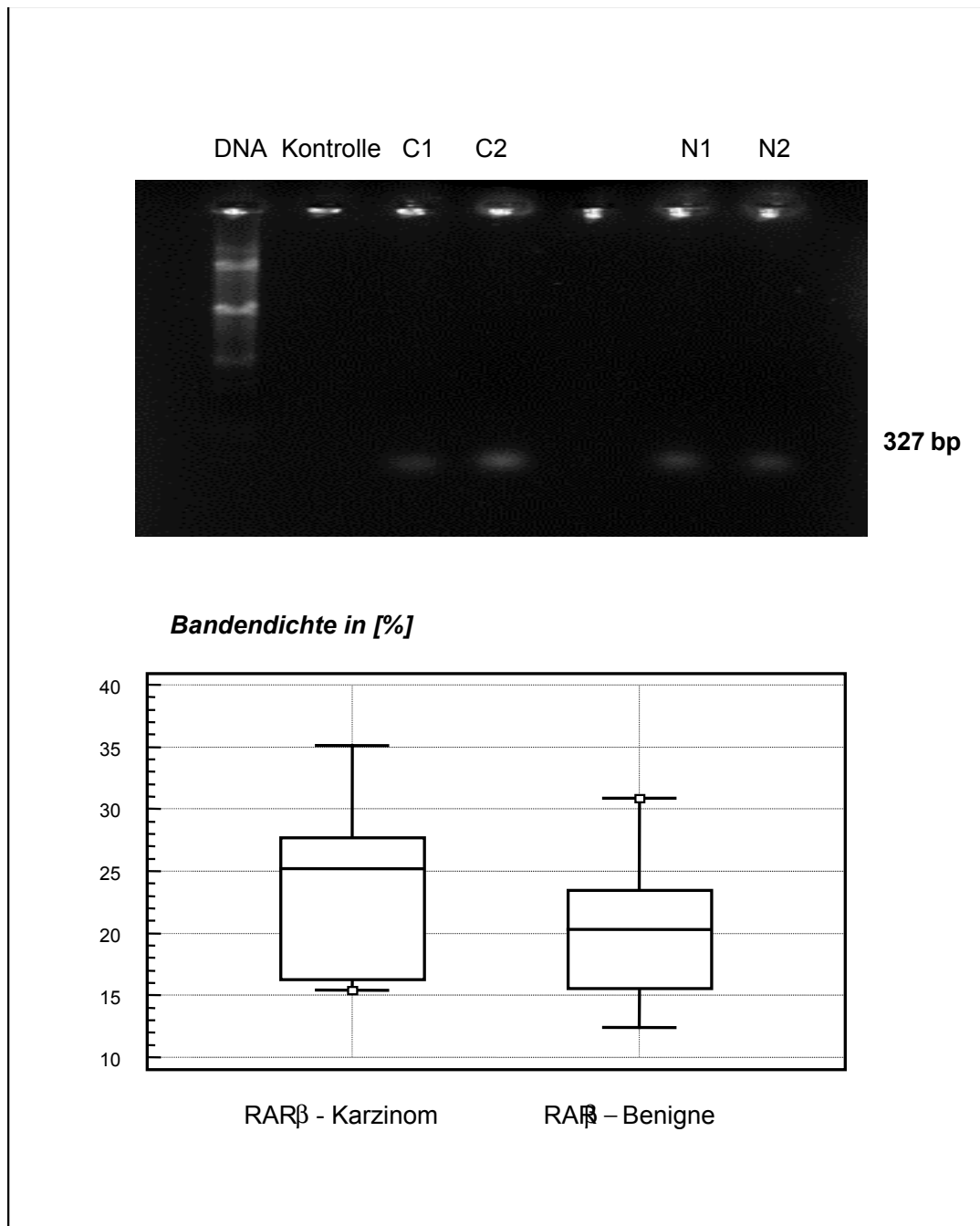


Abb. 17: RT-PCR mit RNA von humanem Prostatagewebe. Vergleich der Expression von RAR β -RNA zwischen benignem [n=25] und malignem [n=25] Prostatagewebe. Primer und RT-PCR-Produkte wie in Tab. 1 angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen Karzinom und benigner Prostata ($n < 0.05$).

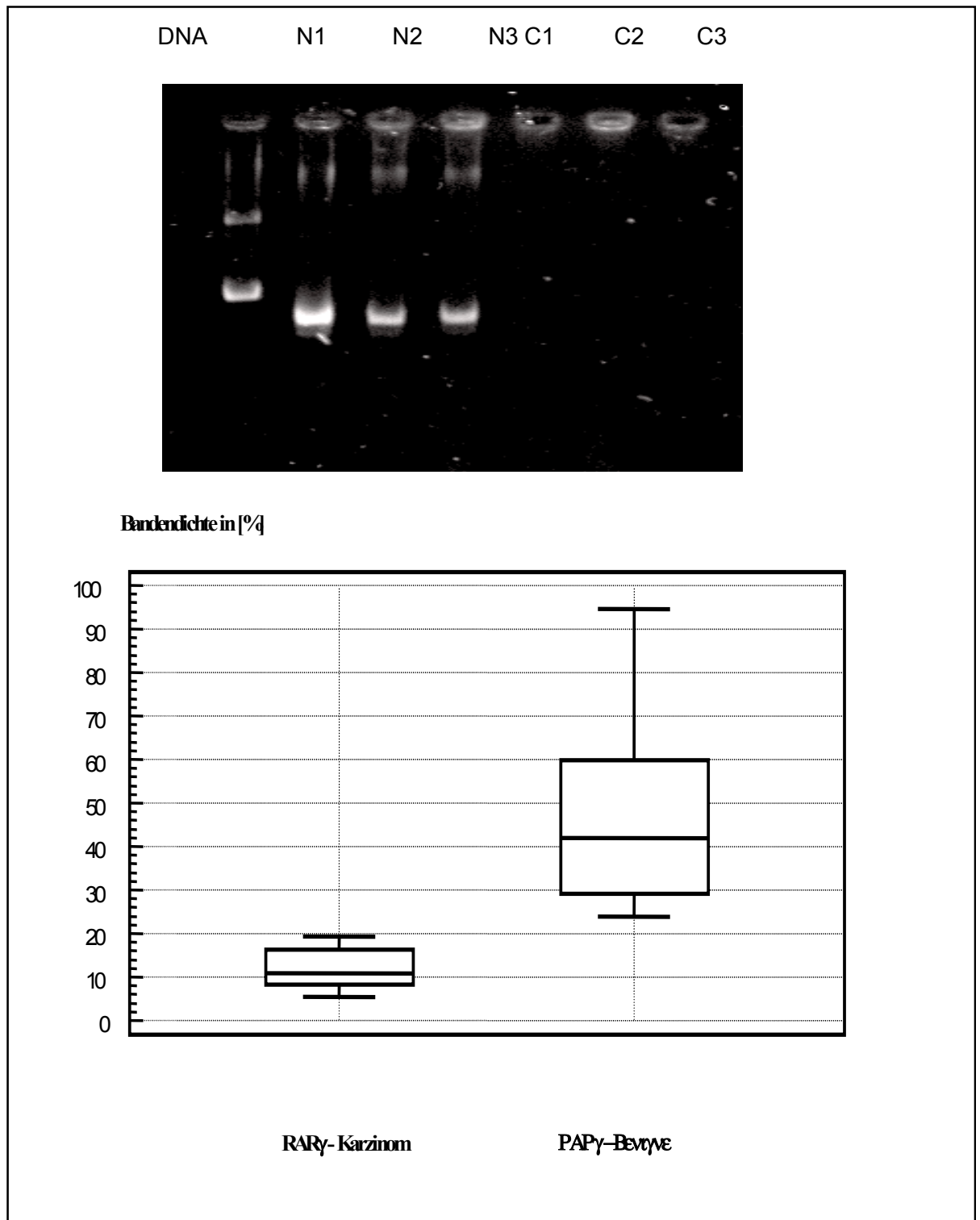


Abb. 18: RT-PCR mit RNA von humanem Prostatagewebe. Vergleich der Expression von RAR γ -RNA zwischen benignem [n=25] und malignem [n=25] Prostatagewebe. Primer und RT-PCR-Produkte wie in Tab. 1 angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen Karzinom und benigner Prostata ($n < 0.05$).

4.6 Western Blots mit Antikörpern gegen RAR α , RAR β , RAR γ , EGFR

Western blots wurden mit Zellysaten von behandelten (RA, T oder deren Kombination) und unbehandelten NRP154 und NRP152 durchgeführt. Dabei war die eingesetzte Proteinmenge pro Lane jeweils 50 μ g. Als Antikörper wurde ein monoklonaler anti-RAR α (Geschenk von Prof. P. Chambon, Strassbourg, France) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet (Abb. 19:).

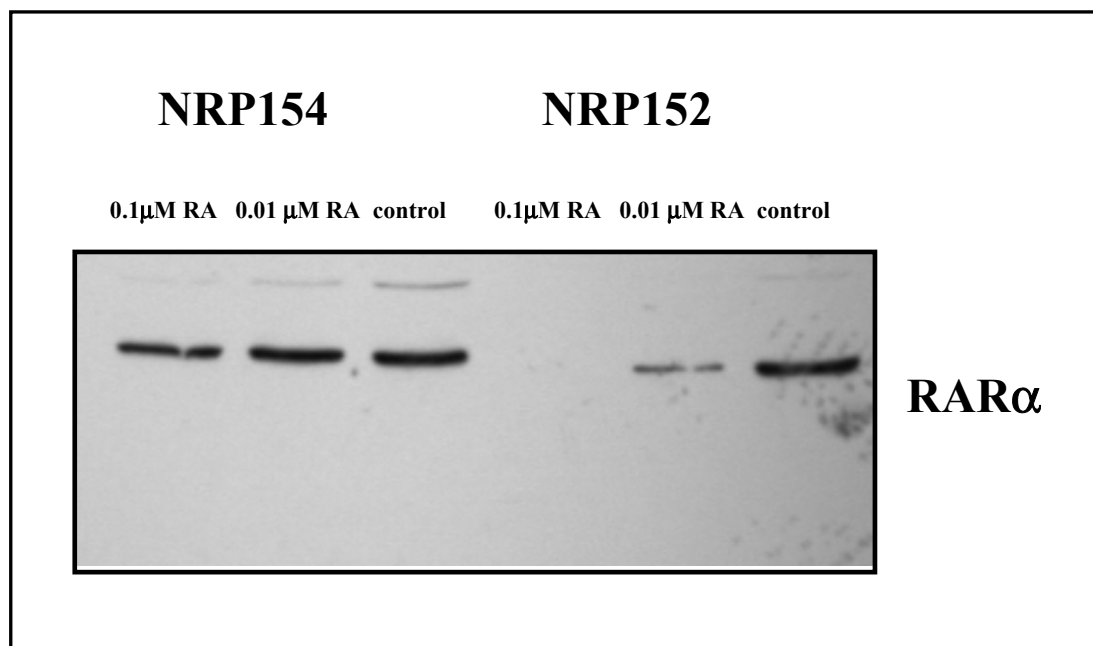


Abb. 19: Western blots mit Proteinlysaten von NRP154 und NRP152-Zellen nach Behandlung mit RA; Monoklonaler RAR α - Antikörper 1:200. ECL-Signal-Detektion.

NRP154 zeigte im Vergleich zu NRP152 eine deutlich höhere Expression von RAR α mit einer etwa doppelten Bandendichte von NRP154 gegenüber NRP152 (Proteinlysate unbehandelter Zellen ;NRP152: NRP154 = 1:2.1). Bei NRP152 wurde die Expression von RAR α durch RA inhibiert, wobei der maximale Effekt bei einer RA-Konzentration von 0.1 μ M gefunden wurde, bei der fast kein RAR α nachweisbar war.

Im Gegensatz dazu zeigte sich, daß bei NRP154 trotz der insgesamt höheren Expression von RAR α , ein inhibierender Effekt von RA hinsichtlich der RAR α -Expression zwar auftrat, aber deutlich geringer ausgeprägt als bei NRP152 (Abb. 20:).

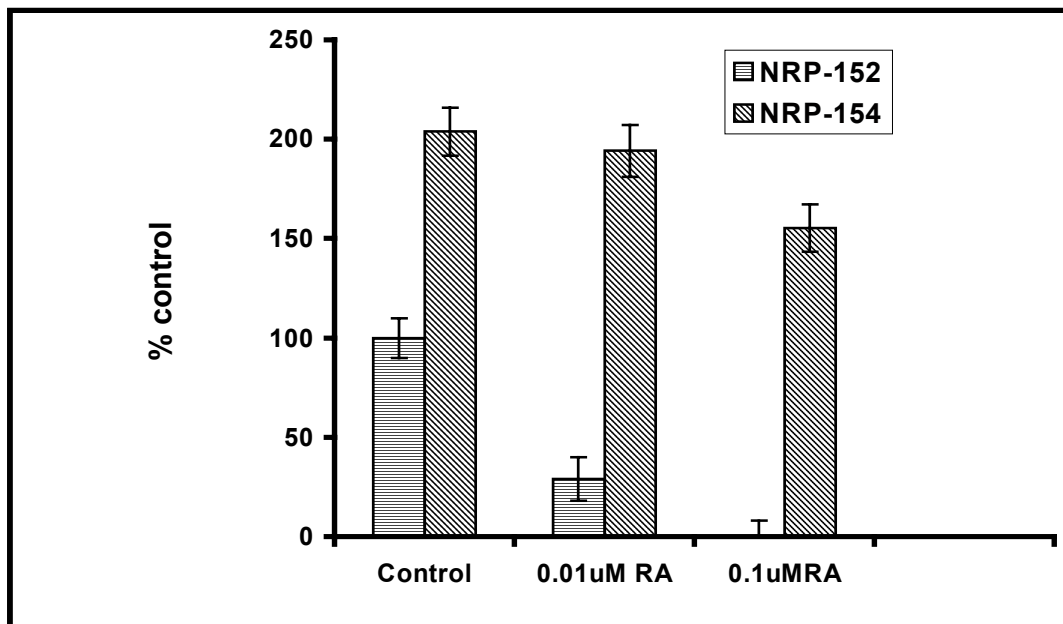


Abb. 20: Western blots mit Proteinlysaten von NRP154 und NRP152-Zellen nach Behandlung mit RA; Monoklonaler RAR α - Antikörper 1:200. ECL-Signal-Detektion. Die Bandendichte von NRP152 =100%. Jede Säule entspricht dem Median+/-SEM von 4 Experimenten.

Western blots mit Anti-RAR α wurden mit Proteinlysaten von LNCaP-Zellen durchgeführt. Der Effekt einer Testosteronbehandlung (4 Stunden in RPMI-Medium supplementiert mit 10% charcoal-stripped FBS) ist in Abbildung 21 dargestellt. Behandlung mit Testosteron (1-200 nM) führte zu einer Stimulierung der RAR α -Expression, wobei der maximale Effekt bei Behandlung mit 20nM Testosteron nachweisbar war.

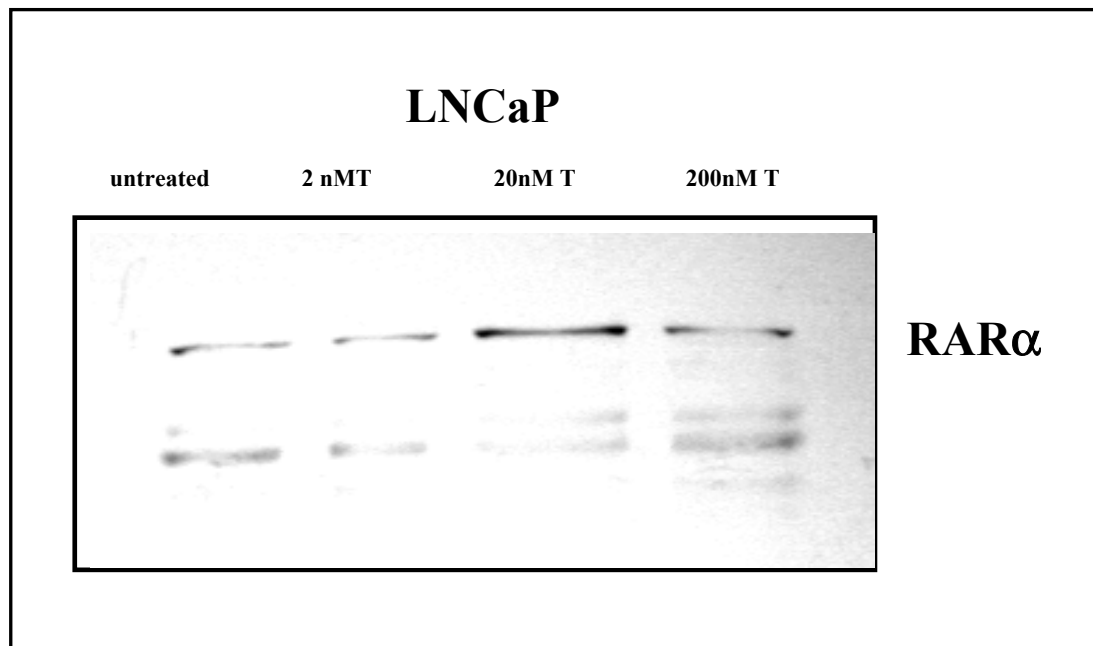


Abb. 21: Western blots mit Proteinlysaten von LNCaP-Zellen nach Behandlung mit Testosteron (T; 0-200nM) ; Monoklonaler RAR α - Antikörper 1:200. ECL-Signal-Detektion.

B) EGF-R

Behandlung von NRP-152-Zellen mit 0.1 μ M RA für 24 Stunden verursachte eine Reduzierung der 170kDa-Bandendichte des EGF-R-Proteins auf 40% des Ausgangswertes ($p < 0.05$; Abb. 19). Andererseits verursachte Behandlung mit 0.02 μ M Testosteron (T) einen Anstieg der 170kDa-Bandendichte des EGF-R-Proteins auf 130% des Ausgangswertes ($p < 0.05$). Dieser Effekt wurde durch simultane Gabe von 0.1 μ M RA eliminiert (Abb. 22:)

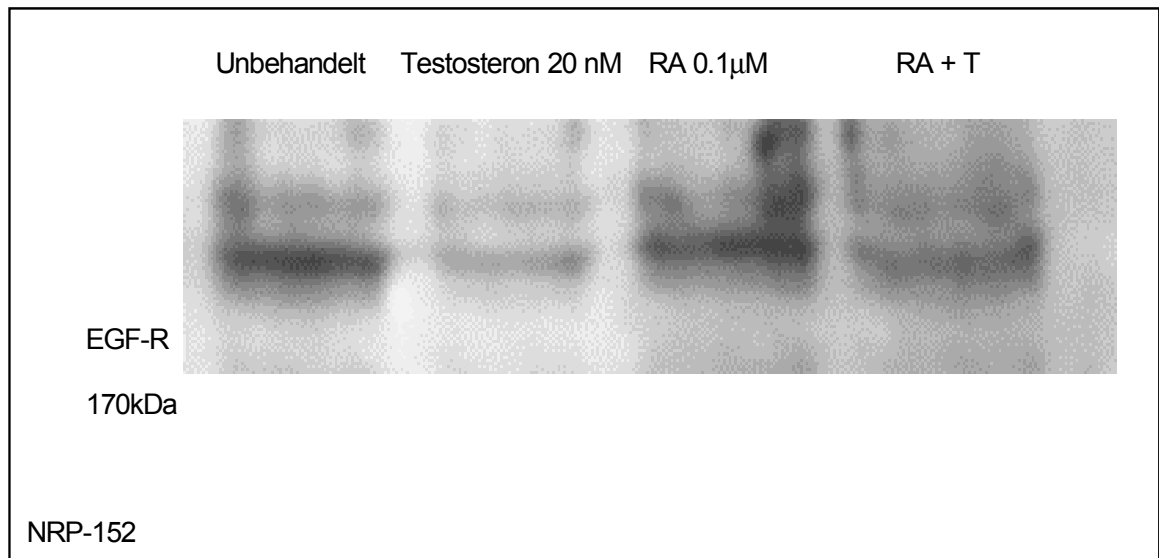


Abb. 22: Western blots mit Anti-EGF-R-Antikörper . 25μg Protein von Zelllysaten (NRP152) nach Behandlung mit Testosteron (T), RA und deren Kombination. Unbehandelte NRP152 zum Vergleich.

Bei NRP-154-Zellen war die 170kDa-Bandendichte des EGF-R-Proteins nach Behandlung mit 0.1μM RA für 24 Stunden ebenfalls reduziert, aber nur auf 60% des Ausgangswertes ($p < 0.05$; Abb.20). Behandlung von NRP-154-Zellen mit Testosteron (T) oder RA+T verursachten keine Veränderung der Bandenintensität der 170kDa- EGF-R-Bande ($p < 0.05$; Abb.22,23)

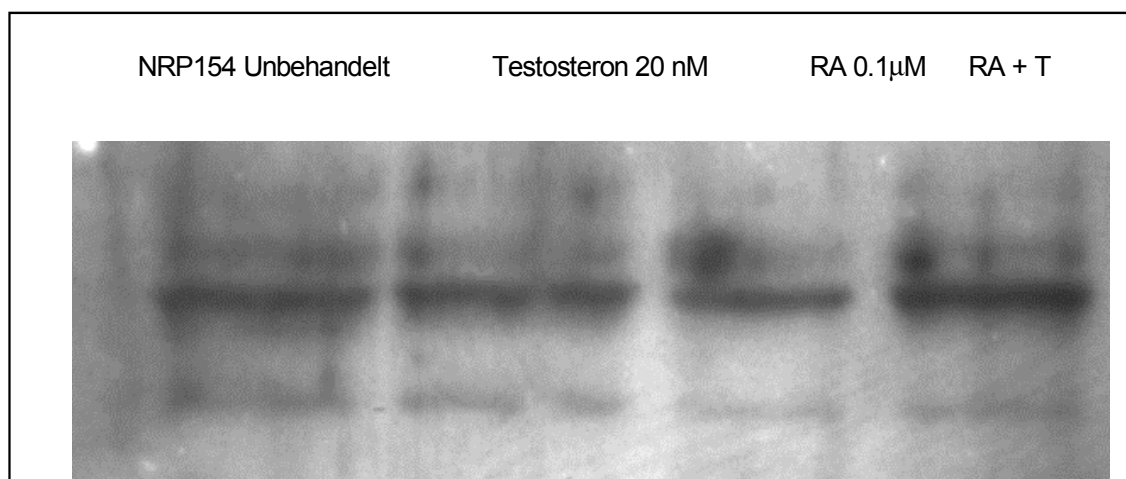


Abb. 23: Western blots mit anti-EGF-R-Antikörper. 25μg Protein von Zelllysaten (NRP154) nach Behandlung mit Testosteron (T), RA und deren Kombination. Unbehandelte NRP154 zum Vergleich.

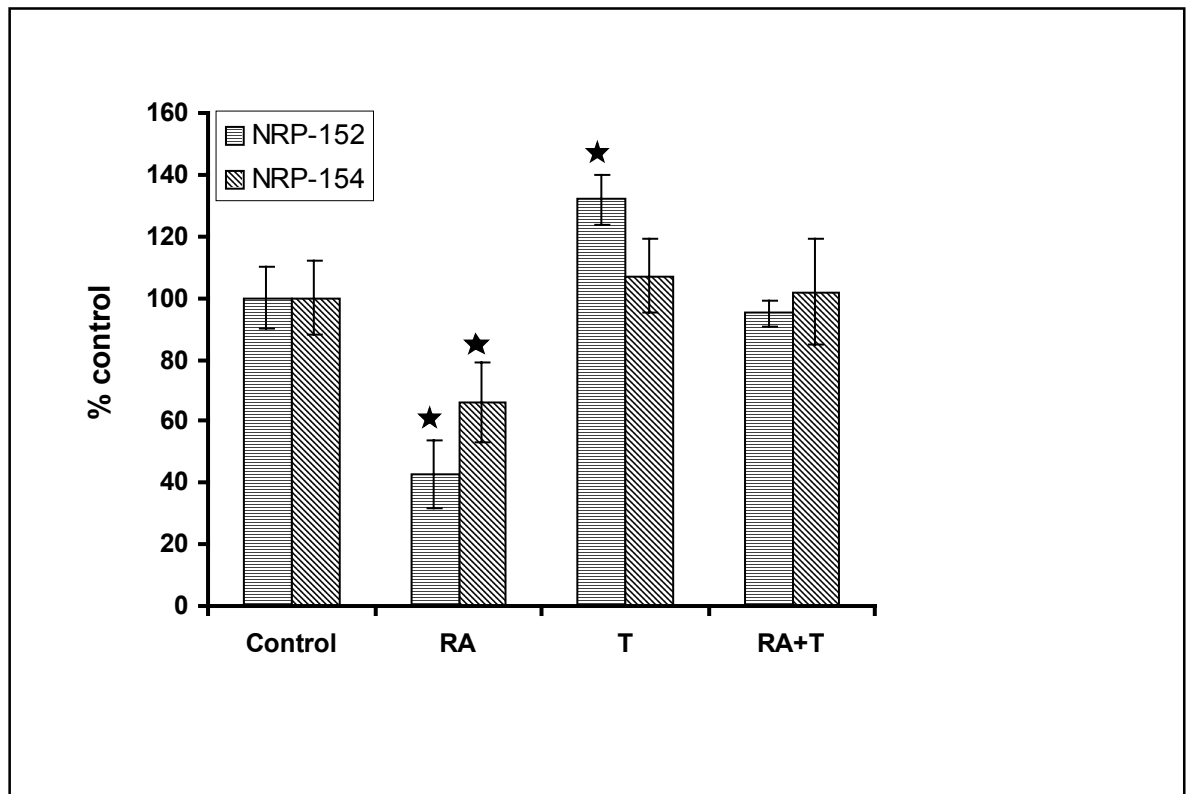


Abb. 24: Effekte von 0.1 μ M RA, 20 nM Testosteron (T) und deren Kombination (RA+T) auf die Expression von EGFR-Protein. Quantitative Analyse der Bandendichten von Westernblots (Abb.19+20) mit Antikörper gegen EGF-R. Resultate sind Mittelwerte \pm SEM von vier identischen experimentellen Ansätzen. * kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (=100% Bandendichte; $p < 0.05$).

4.7 Liganden-Bindungs-Assays mit [125 I]-EGF und [125 I]-IGF1

Behandlung von NRP-152-Zellen mit 0.1 μ M RA für 4 – 48 Stunden verursachte eine kontinuierliche Reduzierung der EGF-R-Verfügbarkeit im Liganden-Bindungs-Assay (Abb. 22) für 48 Stunden-Behandlung; $p < 0.05$). Andererseits verursachte die Behandlung mit 0.02 μ M Testosteron (T) eine 50-75%ige Zunahme der Ligandenbindung. Dieser Effekt wurde durch simultane Gabe von 0.1 μ M RA verhindert.

Behandlung von NRP-154-Zellen mit 0.1 μ M RA resultierte in einer Abnahme der EGF-R-Verfügbarkeit innerhalb von 24 Stunden ($p < 0.05$), die Bindung von [125 I]-EGF kehrte bei 48 Stunden Behandlung zum Ausgangswert zurück (Abb.19). Während die Verfügbarkeit von EGF-R in NRP-154-Zellen ebenfalls durch Testosteron stimuliert wurde (bis zu 8

Stunden; $p < 0.05$), war dieser Effekt bei 24 stündiger Behandlung nicht mehr nachweisbar – ebensowenig war der Antagonistische Effekt der RA-Behandlung, der bei NRP-152-Zellen gefunden wurde, erkennbar (Abb. 25).

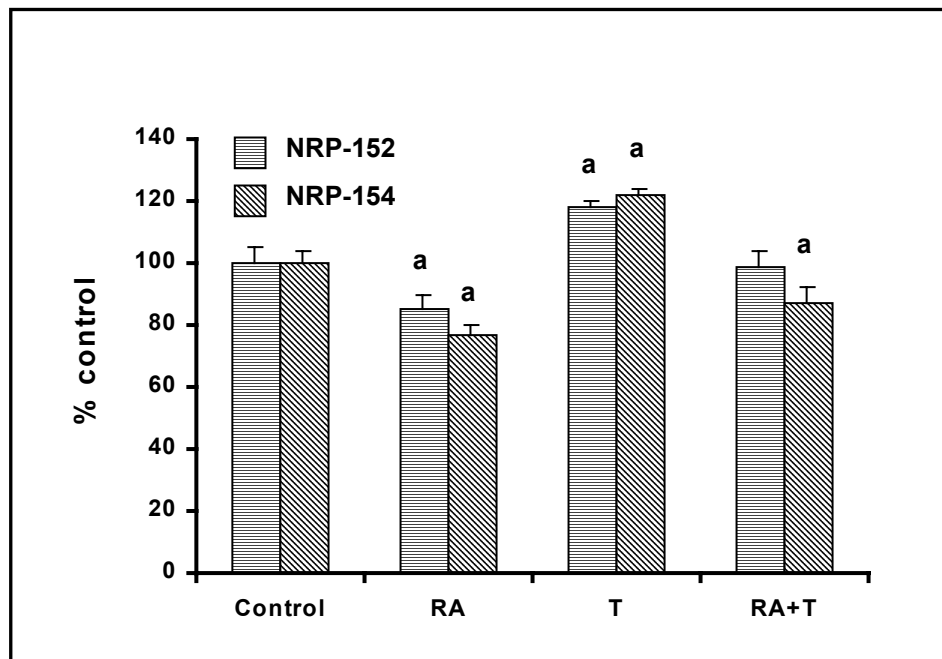


Abb. 25: Die Effekte von 0.1 μ M RA, 20 nM Testosteron (T) und deren Kombination (RA+T) auf die Verfügbarkeit von EGF-R gemessen mittels Liganden-Bindungs-Assays (A) bei NRP152 und (B) bei NRP154 nach verschiedenen Zeitintervallen nach Behandlung. Jede Säule representiert den Median von vier Experimenten und ist als prozentuale Differenz von unbehandelten Kontrollen ausgedrückt. * kennzeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (=100% Bandendichte; $p < 0.05$).

Liganden-Bindungs-Assays mit [125 I]-IGF1 zeigten einen analogen Verlauf wie bei Bindung von [125 I]-EGF für NRP154-Zellen und NRP152-Zellen.

Behandlung von NRP-152-Zellen mit 0.1 μ M RA für 4 – 48 Stunden verursachte eine kontinuierliche Reduzierung der IGF-R-Verfügbarkeit im Liganden-Bindungs-Assay für 48 Stunden-Behandlung; $p < 0.05$). Andererseits verursachte die Behandlung mit 0.02 μ M Testosteron (T) eine 50-75%ige Zunahme der Ligandenbindung. Dieser Effekt wurde durch simultane Gabe von 0.1 μ M RA verhindert.

Behandlung von NRP-154-Zellen mit 0.1 μ M RA resultierte in einer Abnahme der IGF-R-Verfügbarkeit innerhalb von 24 Stunden ($p < 0.05$), die Bindung von [125 I]-IGF1 kehrte bei 48 Stunden Behandlung zum Ausgangswert zurück. Während die Verfügbarkeit von IGF-R in NRP-154-Zellen ebenfalls durch Testosteron stimuliert wurde (bis zu 8 Stunden; $p < 0.05$), war dieser Effekt bei 24 stündiger Behandlung nicht mehr nachweisbar – ebensowenig war der Antagonistische Effekt der RA-Behandlung, der bei NRP-152-Zellen gefunden wurde, nachweisbar.

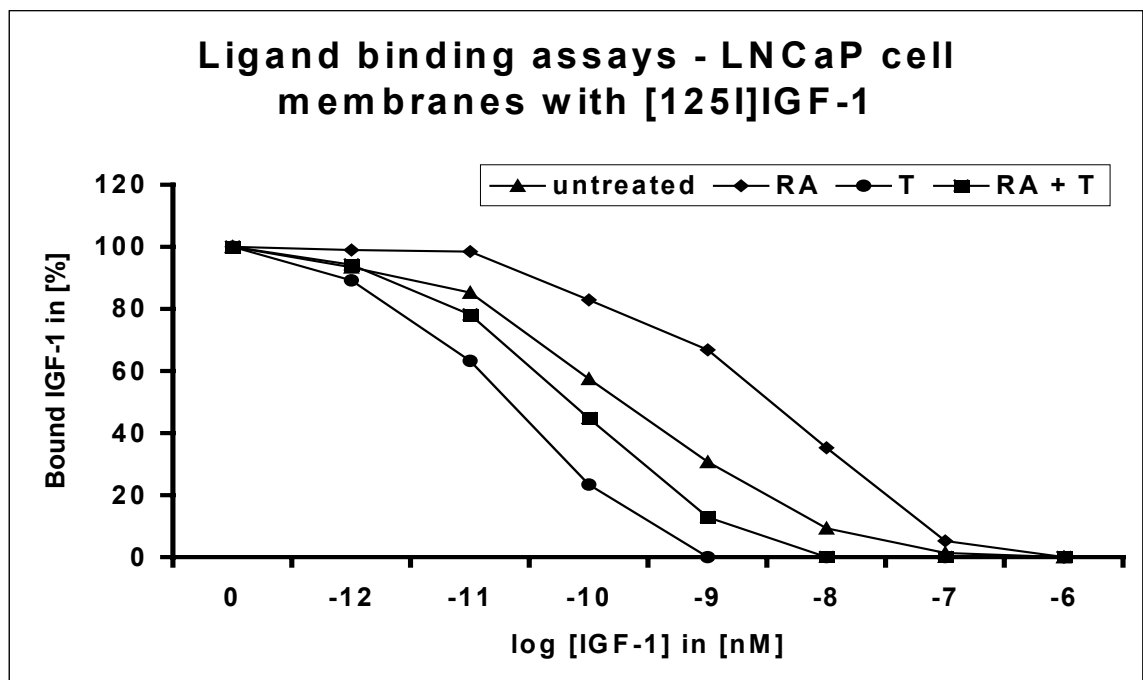


Abb. 26: Ligandenbindungs-Assays mit LNCaP-Zellmembranen inkubiert mit [125 I]-IGF1 steigender Konzentration. RA= 24 Stündige Inkubation mit 0.1 μ M Retinolsäure; T=24 Stündige Inkubation mit 20nM Testosteron. Jeder Punkt entstricht dem Median von vier Versuchsansätzen.

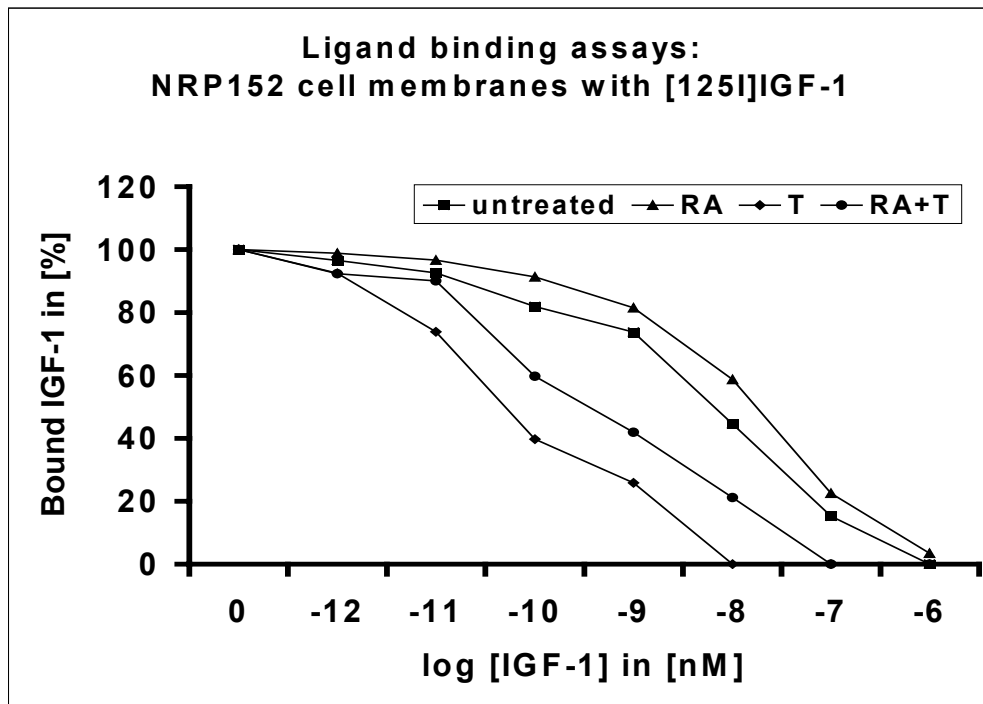


Abb. 27: Ligandenbindungs-Assays mit NRP152-Zellmembranen inkubiert mit [¹²⁵I]-IGF1 steigender Konzentration. RA= 24 Stündige Inkubation mit 0.1µM Retinolsäure; T=24 Stündige Inkubation mit 20nM Testosteron. Jeder Punkt entstricht dem Median von vier Versuchsansätzen.

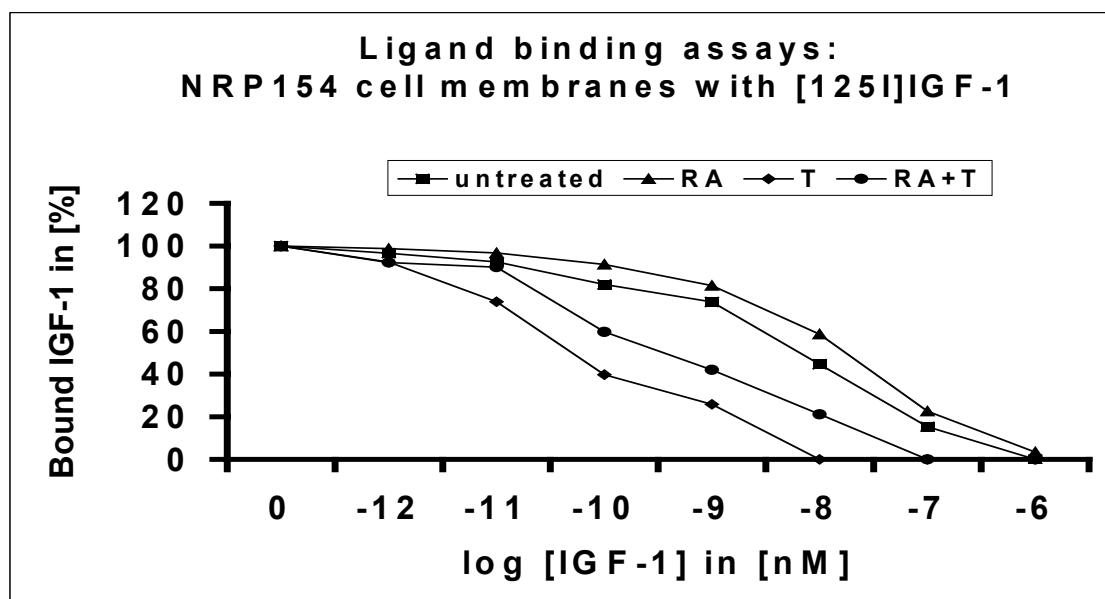


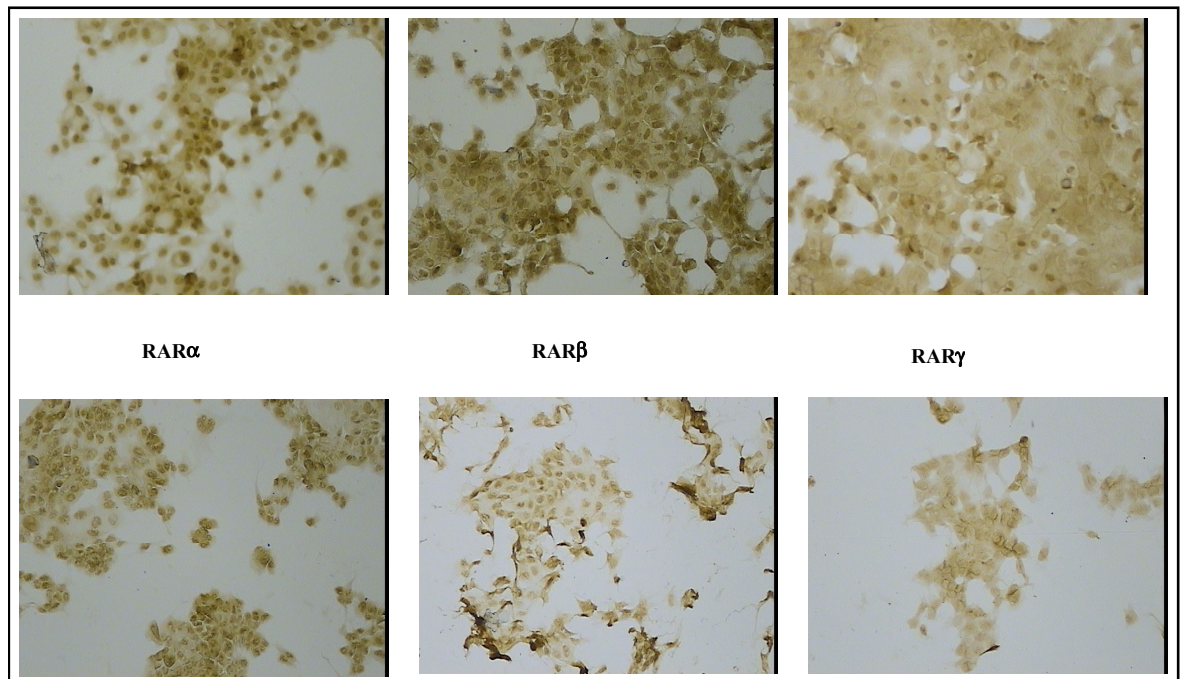
Abb. 28: Ligandenbindungs-Assays mit NRP154-Zellmembranen inkubiert mit [¹²⁵I]-IGF1 steigender Konzentration. RA= 24 Stündige Inkubation mit 0.1µM Retinolsäure; T=24 Stündige Inkubation mit 20nM Testosteron. Jeder Punkt entstricht dem Median von vier Versuchsansätzen.

4.8 Immunhistochemie mit Antikörpern gegen RAR α , RAR β , RAR γ

4.8.1 Zelllinien

Immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen RAR α,γ (human) ergaben Kreuzreaktivität mit den Zelllinien NRP152/NRP154 (Ratte). Dabei war die Immunreaktivität gegen RAR α bei NRP154, LNCaP und PC3 stark positiv. Die Immunreaktivität gegen RAR γ war bei NRP152 deutlich intensiver als bei NRP154 (Abb. 23). Eine semiquantitative Morphometrie wurde durchgeführt, wobei Peroxidase-positiv gefärbte Zellen (positive Zellkern-Anfärbung) ausgezählt und die Intensität der Färbung mittels eines einfachen Scores (0=keine Anfärbung; 1=schwach positiv in <10% der Zellen; 2= moderat positiv in >10% der Zellen; 3= stark positiv in >10% der Zellen) bestimmt wurde (Abb. 29). Bei allen Versuchen wurden parallel negative Kontrollen durchgeführt, bei denen anstelle des primären Antikörpers Serum verwendet wurde. Als Positivkontrollen wurden Gewebsschnitte von Rattentestis mit vorher bestimmter positiver Immunreaktivität verwendet.

A



B

Abb. 29: Immunocytochemie von NRP154 (A) und NRP152 (B) mit anti-RAR α , β , γ -Antikörpern (1:200; Farbdetektion mit Peroxidase –Diaminobenzaldehyd)

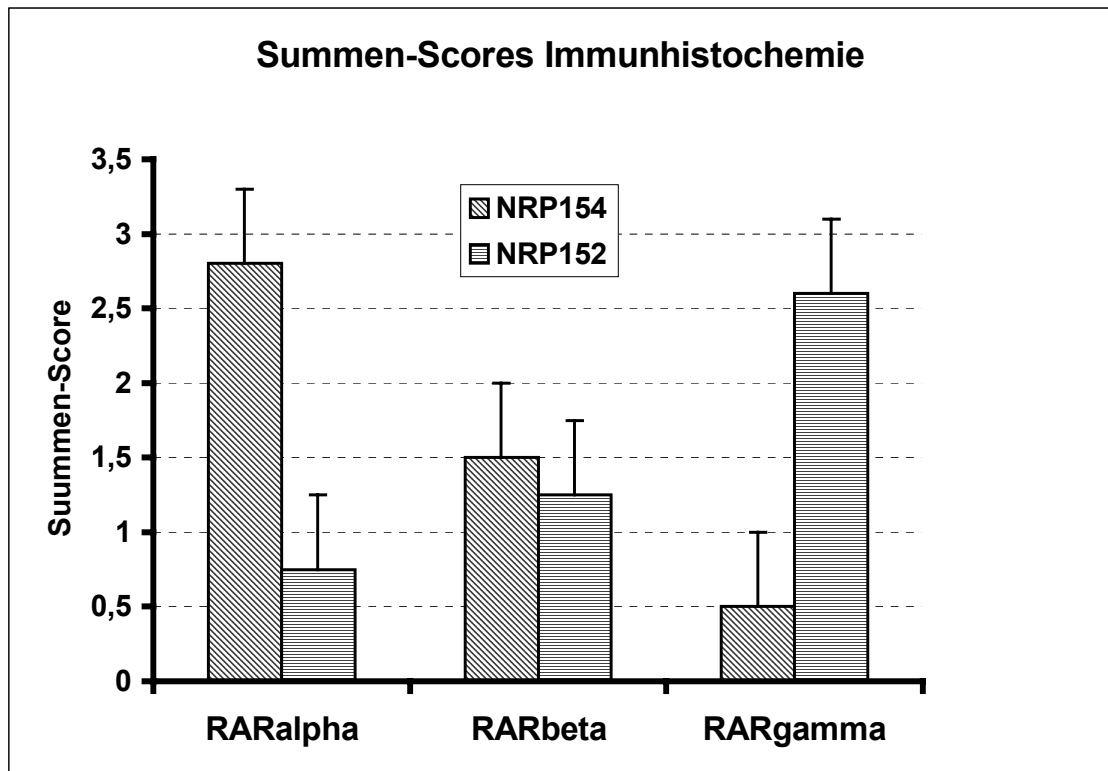


Abb. 30: Semiquantitative Summen-Scores von Immunhistochemischen Färbungen von NRP152 und NRP154, wie in Abb. 23 angegeben. Die durchschnittlichen Summen-Scores sind als Balkendiagramme dargestellt, die Median \pm -SEM von acht Experimenten beinhalten (signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0.01$) sind mittels * markiert).

Wie Abb 30 zeigt, ist die Expression von RAR α in NRP-154 signifikant höher als in NRP152 –Zellen. Die Expression von RAR γ ist demgegenüber signifikant höher in NRP152 , als in NRP154-Zellen. Die Expression von RAR β wies keinen Unterschied zwischen NRP152 und NRP154 auf.

4.8.2 Immunhistochemie mit Rattenprostaten

4.8.2.1 Unterschiede in der Expression der $RAR\alpha$, $RAR\beta$, $RAR\gamma$ in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Rattenprostata

Um Unterschiede in der Expression der $RAR\alpha,\beta,\gamma$ -mRNAs in Abhängigkeit von der Lokalisation des untersuchten Gewebes (ventrale und dorsale Ratten-Prostaten) wurde Poly(A)-RNA aus den dorsalen und ventralen Lappen von Rattenprostaten separat isoliert. Zum Vergleich wurde Poly(A)-RNA aus der gesamten Rattenprostata isoliert. Northern Blot-Hybridisierung mit den RAR-cDNAs¹ wurde wie oben angegeben durchgeführt.

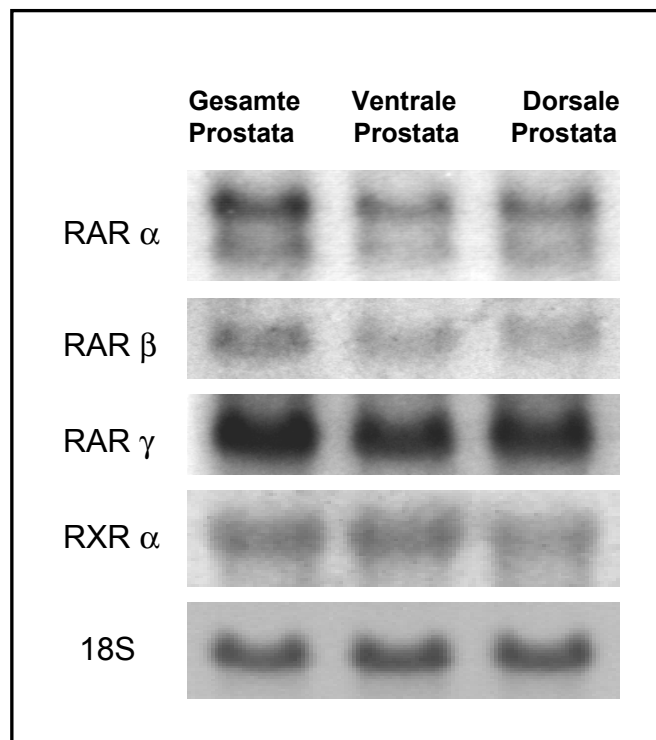


Abb. 31: Unterschiedliche Expression der RARmRNAs in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Prostata der Ratte (Northern blots mit 15µg Poly(a)RNA isoliert aus deventralen, dorsalen Lobulus der Ratten-Prostata oder der gesamten Ratten-Prostata. Normalisierung gegen 18S-RNA.

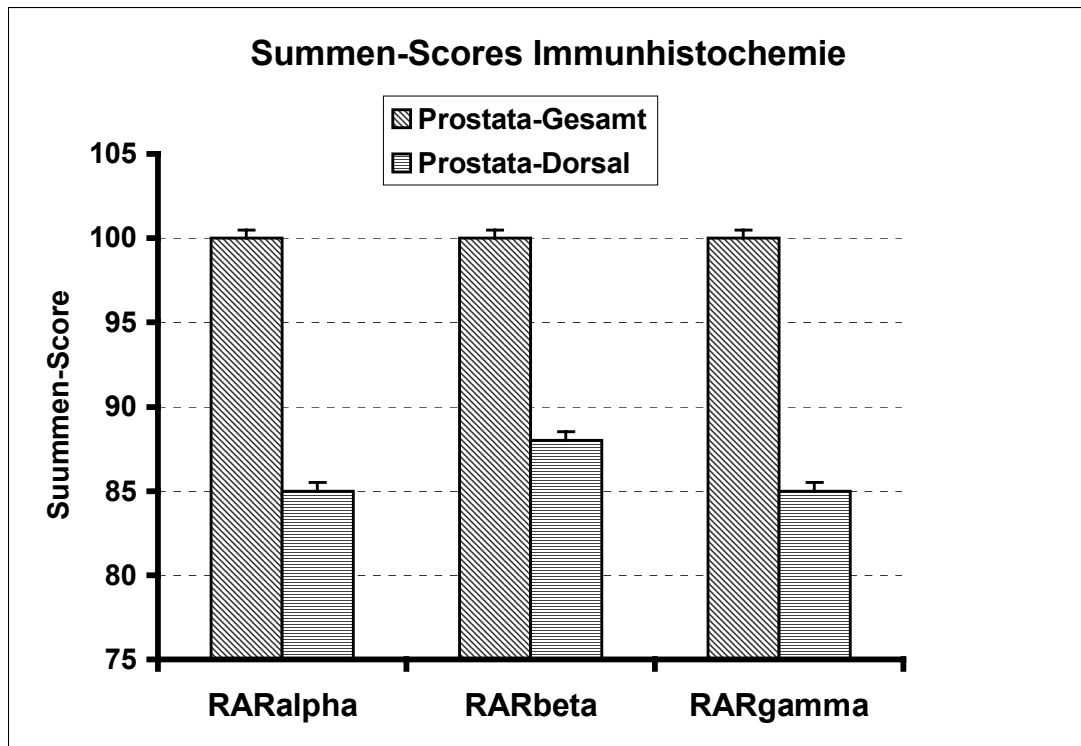


Abb. 32: Unterschiedliche Expression der RARmRNAs in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Prostata der Ratte (Northern blots mit 15µg Poly(a)RNA isoliert aus deventralen, dorsalen Lobulus der Ratten-Prostata oder der gesamten Ratten-Prostata. Quantifizierung des in Abb.25 dargestellten Versuchs. Die Bandendichte jedes Transkripts in jeder Probe wurde normalisiert gegen 18S-RNA und als Prozent des Nullwertes berechnet. Jede Säule entspricht dem Median+/-SEM von 4 Experimenten. Expression der RAR in der Gesamtprostata = 100%.

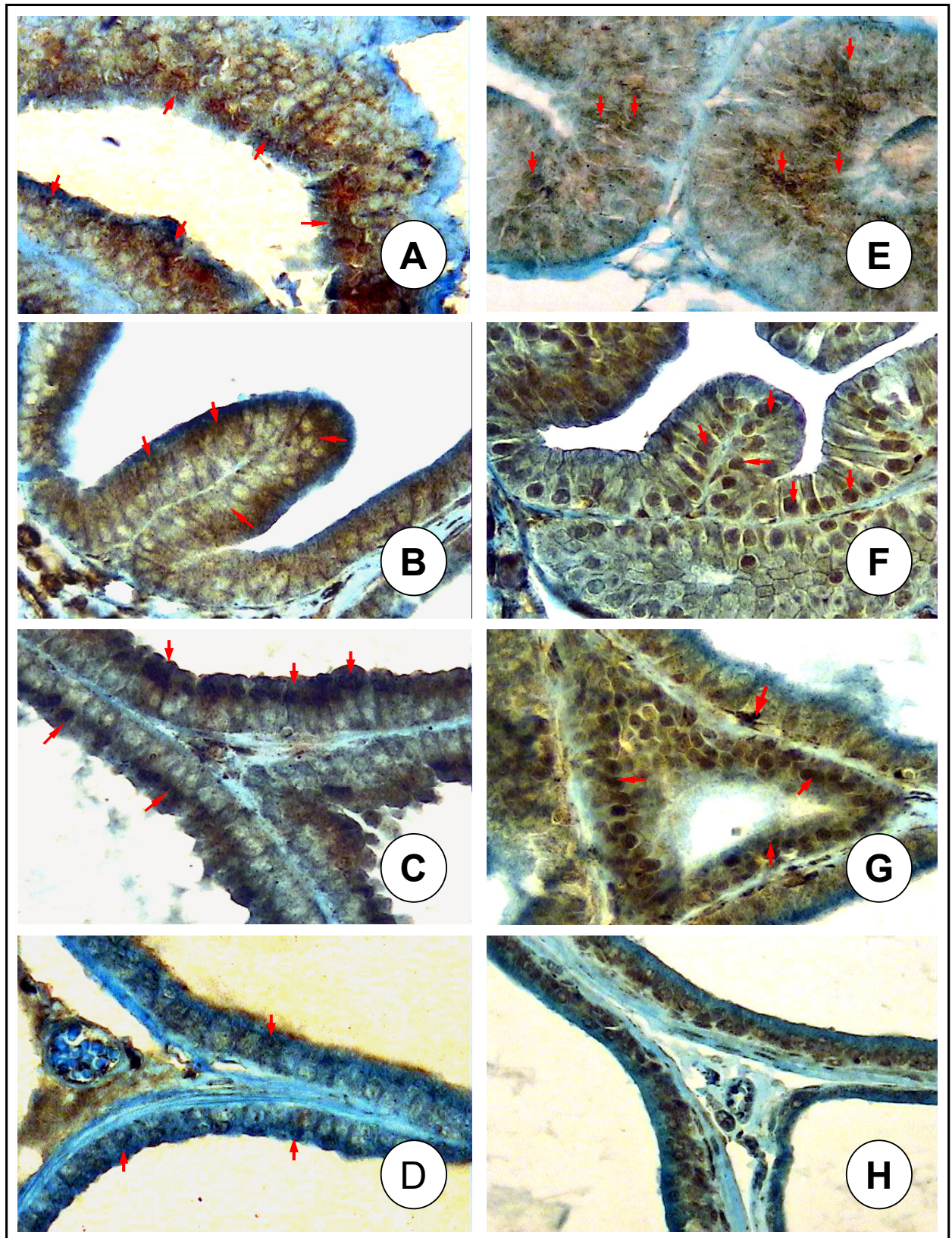


Abb. 33: Expression von RARs in der Prostata der Ratte. Immunhistochemie mit anti RAR α . (1:200)

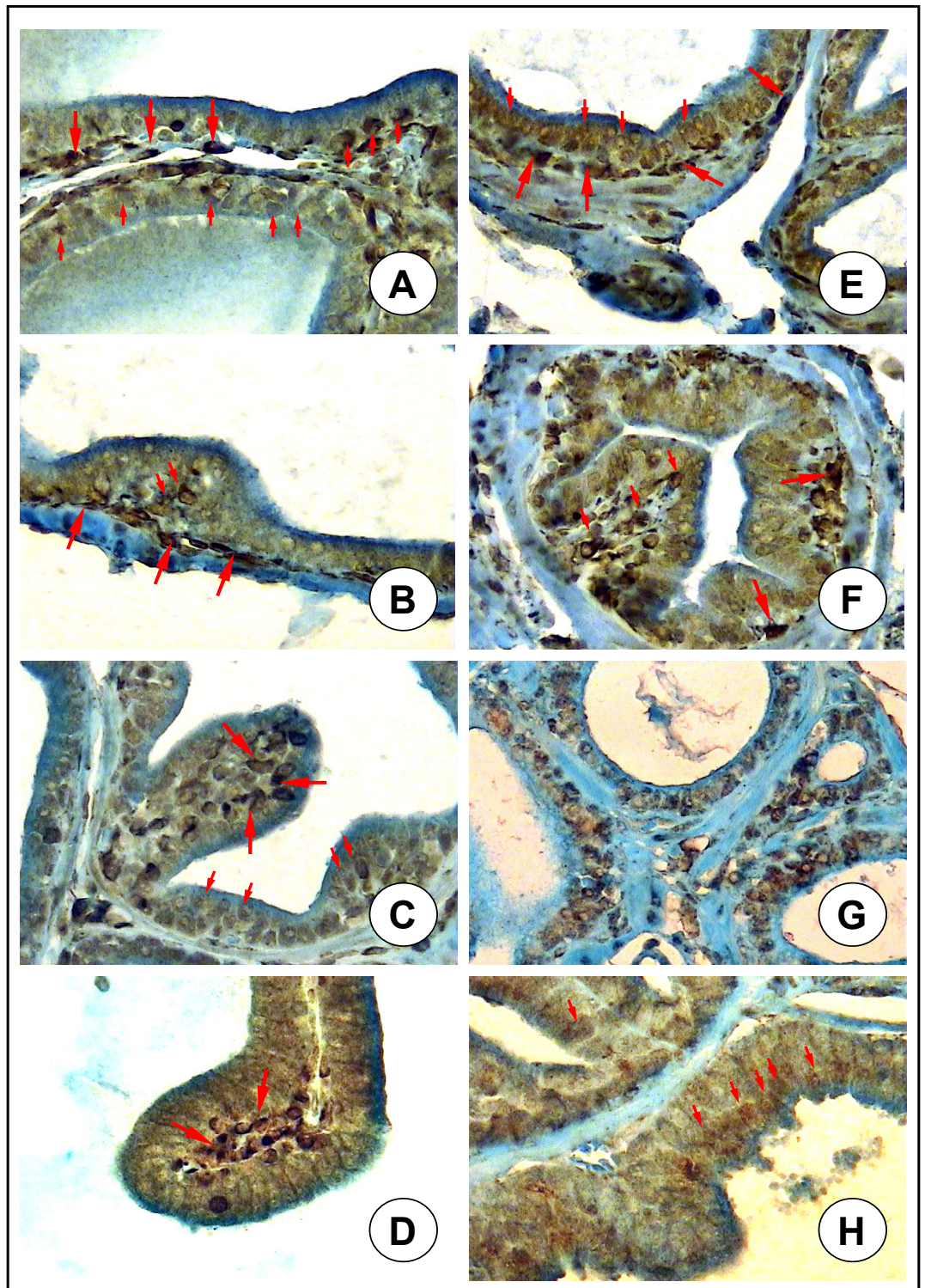


Abb. 34: Expression von RARs in der Prostata der Ratte. Immunhistochemie mit anti RAR γ . (1:200)

4.8.2.2 Einfluß von Kastration auf die Expression der RAR α , RAR β , RAR γ im Rattenmodell

Um den bereits in Zellkultur-Experimenten nachgewiesenen Effekt der Interaktion von Androgenen mit den RARs zu simulieren, wurden Kastrationsversuche mit Ratten durchgeführt. Dabei dienten unbehandelte Tiere als Kontrollgruppe. Bei den kastrierten Tieren wurden nach 12 Stunden, 1,2,3 und 6 Tagen die Prostaten (Gesamt-Prostata) entfernt und das Gewebe zur Gewinnung von Poly(A)RNA für Northern-Blot Hybridisierungen mit RAR-cDNAs verwendet. Dabei zeigte sich, daß sowohl die Expression von RAR α -mRNA, als auch die Expression von RAR γ -mRNA nach Kastration bis zu einem Zeitraum von 6 Tagen zunimmt (Abb.35). Die subkutane Gabe von Depot-Testosteron nach Kastration beweist, daß Testosteronmangel für die vermehrte Expression der RAR α - und RAR γ -mRNA verantwortlich ist, da Testosteron-Supplementierung die Expression der RAR-mRNAs` auf den Level von unkastrierten Tieren zurücksetzt (Abb.35)

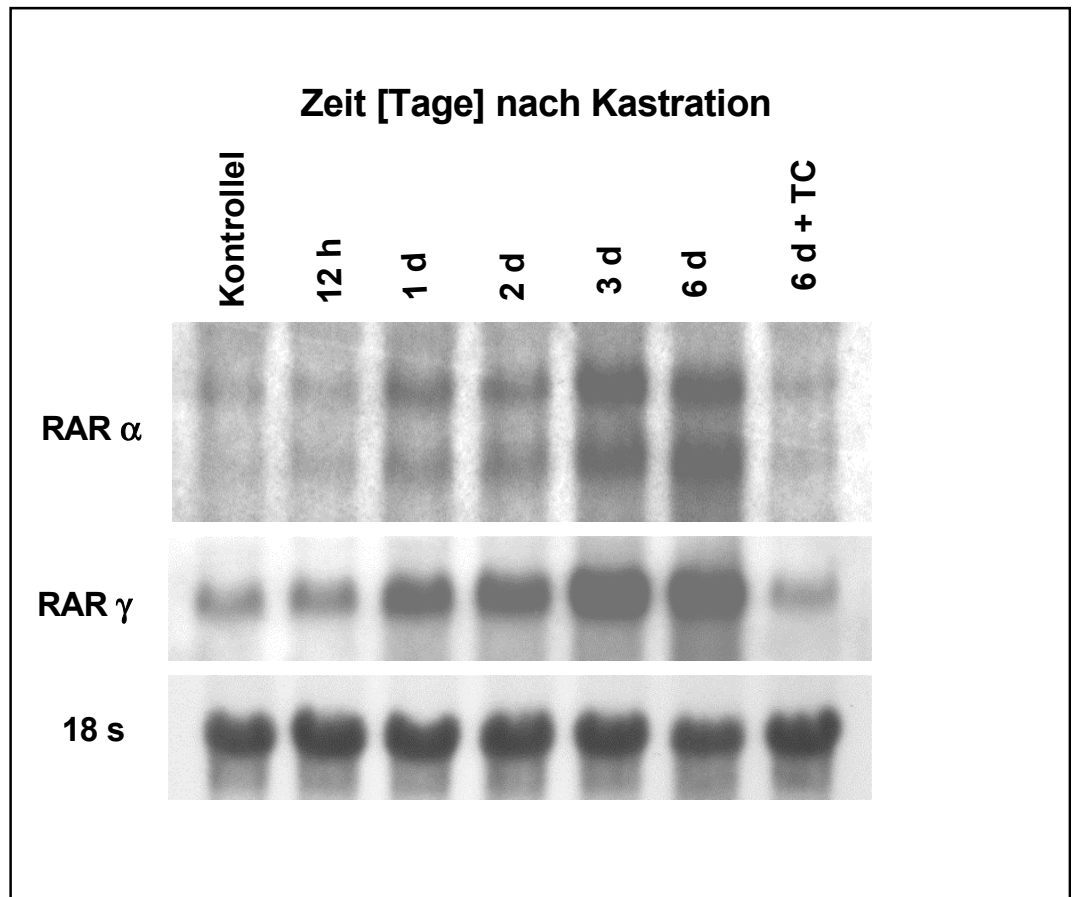


Abb. 35: Kastrationseffekt auf die Expression von RAR α -mRNA und RAR γ -mRNA nach verschiedenen Zeitintervallen nach Kastration in der Prostata der Ratte. Northern blots mit 15 μ g Poly(A)-RNA aus Ratten-Prostaten unbehandelt (Kontrolle) und nach verschiedenen Zeitintervallen nach Kastration. Normalisierung gegen 18S-RNA.

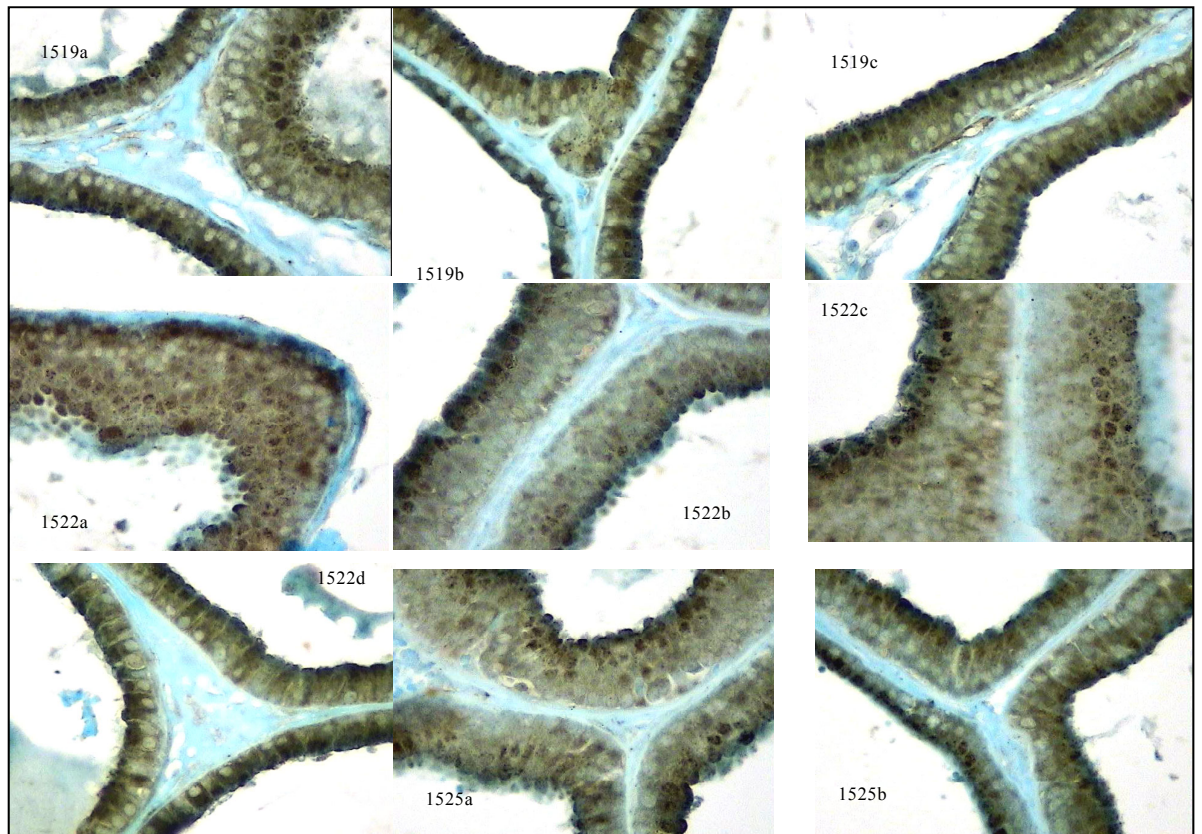


Abb. 36: Kastrationseffekt auf die Expression von RAR β in ventraler und dorsaler Prostata der Rat.te (Immunhistochemie mit anti-RAR β ; 1:1000;)

4.8.2.3 Einfluß einer chemisch induzierten Karzinogenese auf die Expression der $RAR\alpha$, $RAR\beta$, $RAR\gamma$ im Rattenmodell

Nach Induktion einer Karzinogenese mittels IV-Injektion von Methyl-Nitrosoharnstoff (MNU) in die Schwanzvene von Lobund-Wistar-Ratten, gefolgt von subkutaner Gabe von Testosteronkapseln (1cm), wiesen 90% der so behandelten Tiere histologische Veränderungen im Sinne eines Prostatakarzinoms auf. Unbehandelte Tiere wurden als Kontrollgruppe verwendet. Die Prostaten der behandelten (und unbehandelten Tiere zur Kontrolle) wurden nach 0,3,6,12,24 und 40 Wochen nach Behandlungsbeginn entfernt. Das Prostatagewebe, welches nicht für Gewebsschnitte verwendet wurde, wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die Isolierung von Gesamt-RNA verwendet. RT-PCR mit den oben angegebenen Primern diente der Untersuchung der Expression der RAR -mRNAs im zeitlichen Verlauf der Karzinogenese im Rattenmodell.

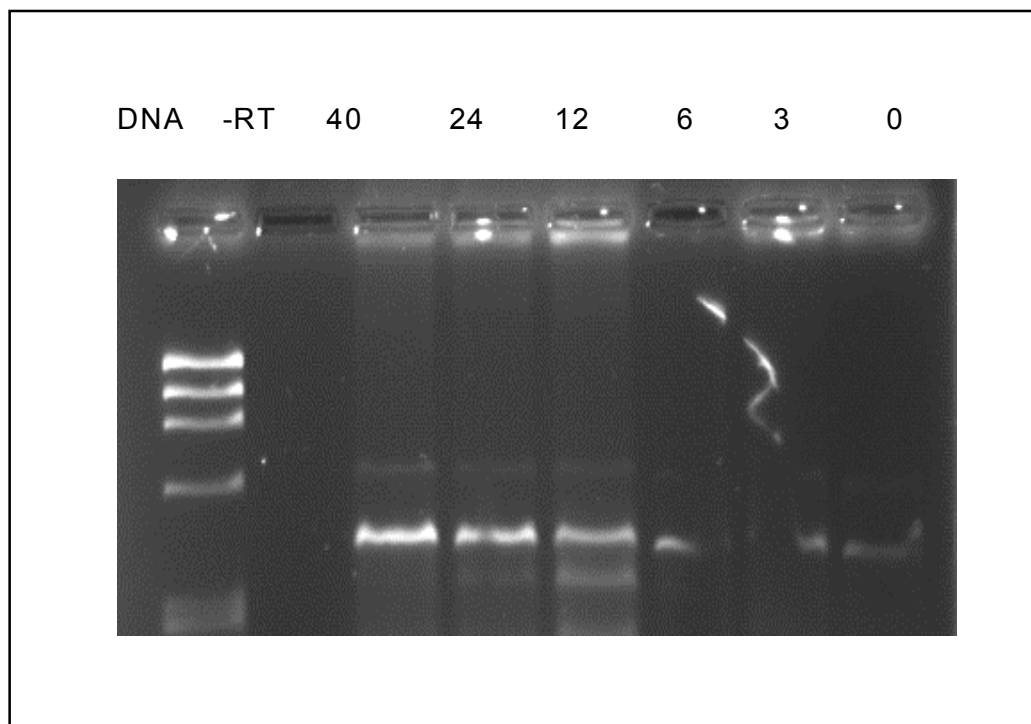


Abb. 37: Expression von $RAR\alpha$ mRNA in Lobund-Wistar-Ratten nach Behandlung mit MNU + Testosteron in Abhängigkeit von der Zeit (in Wochen) nach Behandlungsbeginn.

Die Expression von $RAR\alpha$ -mRNA wurde im Verlaufe der Karzinogenese (Vergleich $t=0$ mit $t=40$ Wochen) auf das durchschnittlich 10fache des Ausgangswertes erhöht (6 behandelte Tiere pro Gruppe – 4 unbehandelte Kontrolltiere pro Gruppe zum Vergleich).

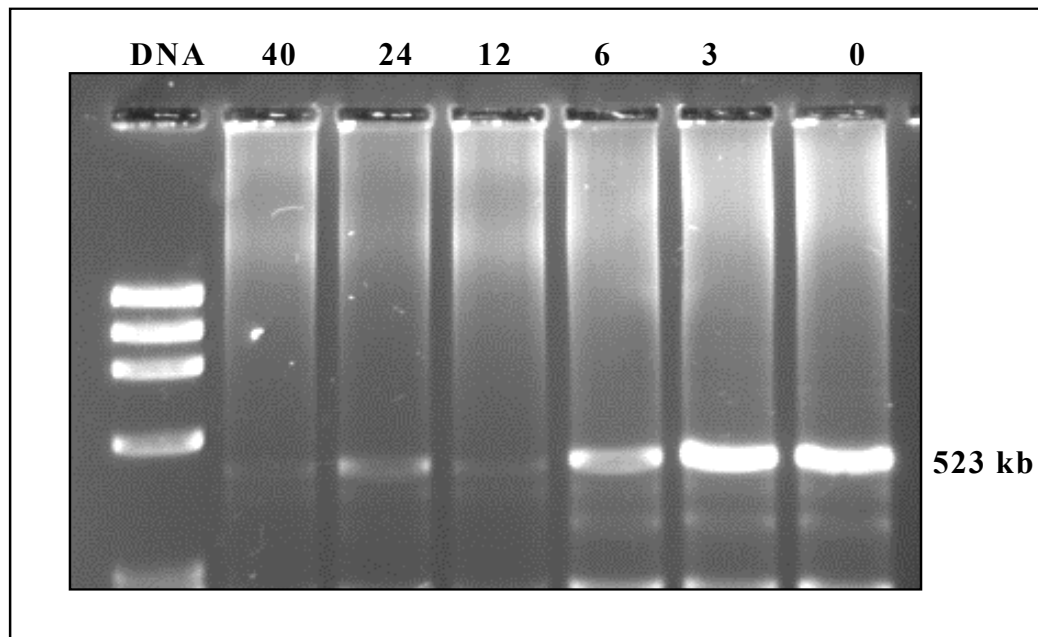


Abb. 38: Expression von RAR γ mRNA in Lobund-Wistar-Ratten nach Behandlung mit MNU + Testosteron in Abhängigkeit von der Zeit (in Wochen) nach Behandlungsbeginn.

Die Expression von RAR γ -mRNA, ausgedrückt in der Bandendichte nach RT-PCR, wurde im Verlaufe der Karzinogenese (Vergleich t=0 mit t=40 Wochen) auf durchschnittlich 1% (1/100 des Ausgangswertes) gesenkt (6 behandelte Tiere pro Gruppe – 4 unbehandelte Kontrolltiere pro Gruppe zum Vergleich).

Im Vergleich zu den oben angegebenen RAR α - und RAR γ -mRNA, änderte sich die Expression von RAR β -mRNA im Verlauf der Karzinogenese im Lobund-Wistar-Rattenmodell, ausgedrückt in der Bandendichte nach RT-PCR, nicht signifikant.

4.8.3 Immunhistochemie – Gewebsschnitte mit humaner Prostata

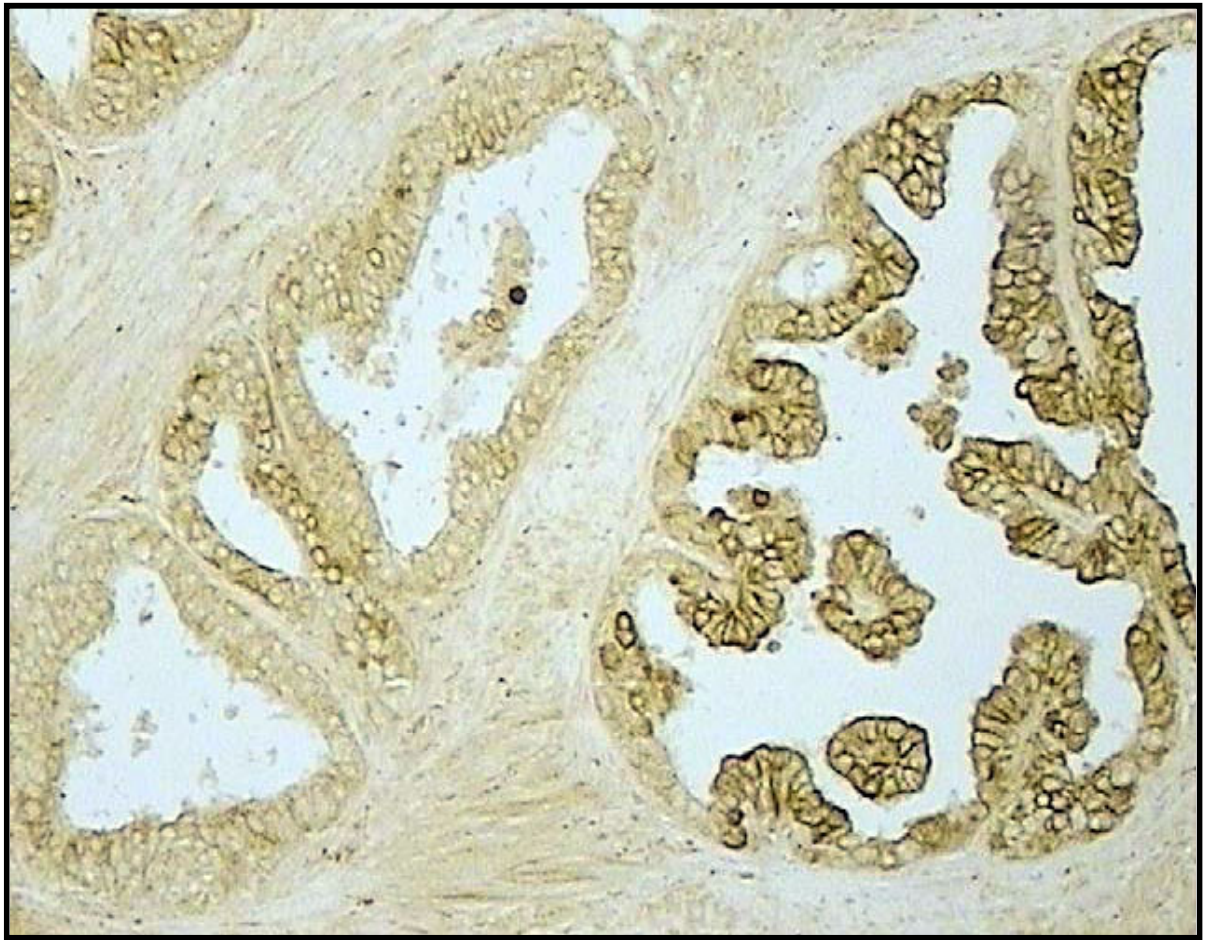


Abb. 39: Unterschiede in der Expression von RAR γ in Prostatakarzinom (links) und BPH (rechts) in menschlicher Prostata. Immunhistochemie mit Semidünnschnitten nach Radikaler Prostatektomie wegen eines Gleason 6 Prostata-Karzinoms.

Immunhistochemische Färbungen wurden verwendet, um die Lokalisation der RAR-Expression in archiviertem, formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten menschlichem Prostatagewebe nachzuweisen. Die Anfärbbarkeit der Prostata-Schnitte wurde mit einem semi-quantitativen Score ausgewertet. Dabei wurde die Immunreaktivität wie folgt beurteilt: 0=negativ; 1=schwach positiv in <10% der Epithelzellenellen; 2=moderat positiv in 10% der Epithelzellen; 3=stark positiv in >10% der Epithelzellen eines Azinus. Insgesamt wurden jeweils 8 Gewebsschnitte von 12 undifferenzierten Adenokarzinomen (Gleason >6) , jeweils 8 Gewebsschnitte von 12 hoch differenzierten Adenokarzinomen (Gleason <7) und jeweils 4 Schnitte von 12 normalen Prostataen untersucht.

Im Drüsenepithel von histologisch normalem Prostata-Gewebsschnitten, war RAR γ -Immunreaktivität im Zytoplasma in homogener Verteilung nachweisbar (Abb.38). Die RAR γ -Immunreaktivität war 2+ in über 90% der untersuchten Azini und 3+ in den übrigen Azini (<10%). Während der Gesamt-Score für die RAR γ -Immunreaktivität in Adenokarzinomen mit Gleason-Grading <6 vergleichbar war mit normalem Prostatagewebe, variierte die Farbintensität zwischen Epithelzellenn innerhalb der Azini. Die in normalem Prostatagewebe beobachtete homogene Anfärbbarkeit der Endothelzellen innerhalb eines Azinus weicht einer Heterogenität hinsichtlich der Immunreaktivität. Diese Befunde wurden in Adenokarzinomen mit Gleason-Grading <7 und in PIN gesehen (Abb.39). In Adenokarzinomen mit Gleason Grading >7 (undifferenzierte Karzinome), war nur noch eine schwache oder keine Immunreaktivität gegen RAR γ nachweisbar (Abb.40).

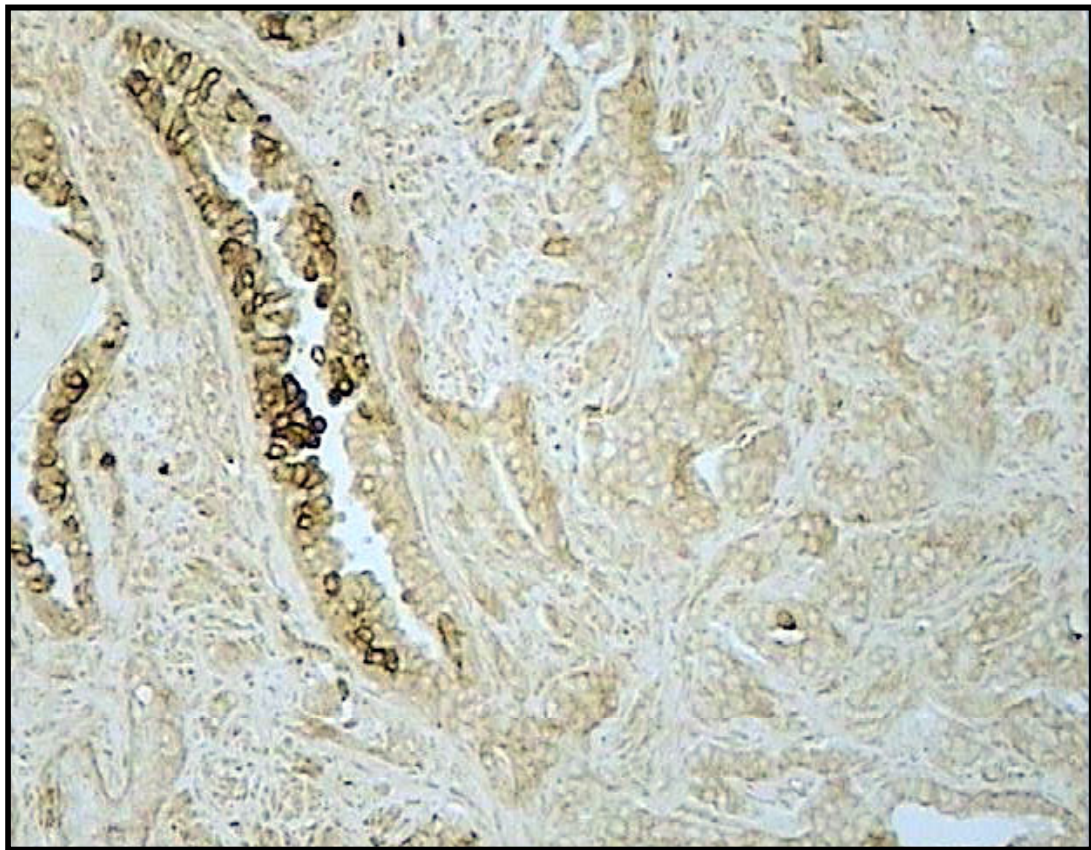


Abb. 40: Immunhistochemie mit anti-RAR γ -Antikörpern. Undifferenziertes Prostatakarzinom (Gleason >7) links im Bild ohne Nachweis von Immunreaktivität gegen RAR γ . Rechts im Bild: PIN mit heterogener Anfärbung eines Azinus.

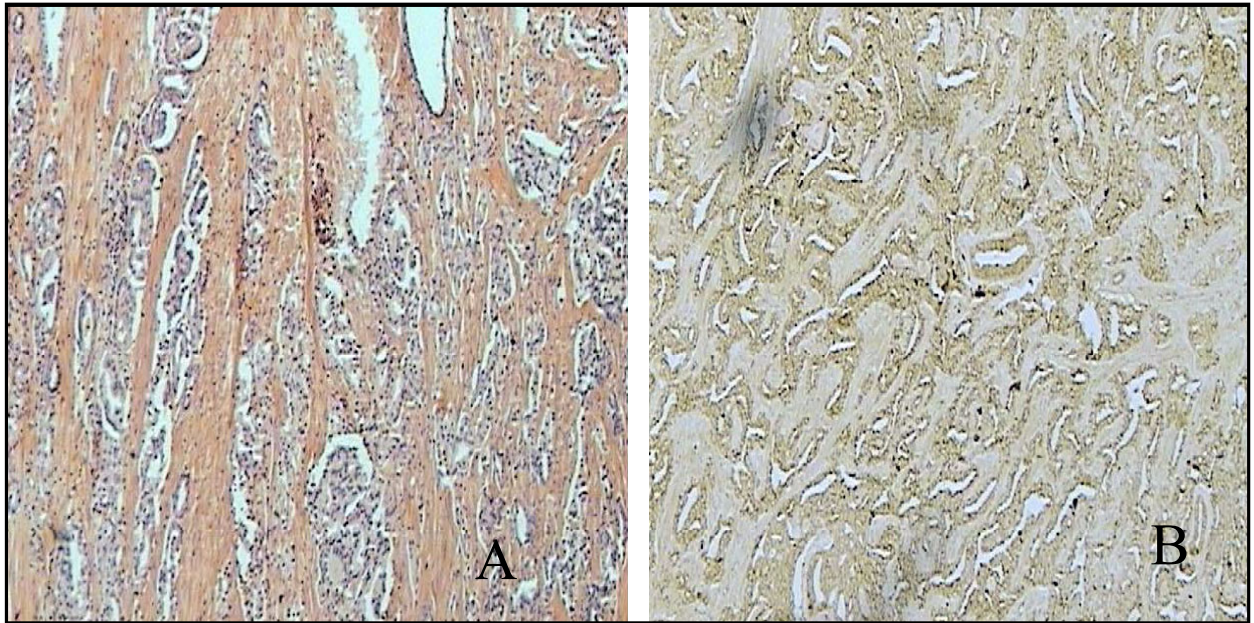


Abb. 41: A) Hematoxylin-Eosin-Färbung eines undifferenzierten Prostatakarzinoms. B) Verlust der Immunreaktivität gegen RAR γ bei einem undifferenzierten Prostatakarzinom.

Tab. 3: Grad der Immunreaktivität (semi-quantitativ) und Anzahl immunpositiver Zellen pro Azinus. Vergleich von Gewebsschnitten aus menschlichem Prostatagewebe zwischen benigner Prostata (Normal); PIN, hochdifferenzierten (Gleason <7) Prostatakarzinomen (LGPCa) und undifferenzierten (Gleason >6) Prostatakarzinomen (HGPCa). Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen mit $p < 0.05$.

| | | | | | |
|--------------|---|--------|------------|------------|------------|
| RAR α | Immunreaktivität [0-3] | 0.4 | 1.71 | 2.42 | 2.83 |
| | Anteil immunpositiver Zellen pro Azinus [%] | 74.6% | 25.4% | 75.1% | 82.7% |
| | | | $P < 0.05$ | $P < 0.05$ | $P < 0.05$ |
| | | Normal | PIN | LGPCa | HGPCa |
| RAR β | Immunreaktivität [0-3] | 1.52 | 0.7 | 1.9 | 1.97 |
| | Anteil immunpositiver Zellen pro Azinus [%] | 55% | 32% | 46.5% | 69.7% |
| | | | $P < 0.05$ | N.S. | N.S. |
| RAR γ | Immunreaktivität [0-3] | 2.62 | 2.29 | 0.26 | 0.08 |
| | Anteil immunpositiver Zellen pro Azinus [%] | 72.2% | 33.2% | 73.5% | 92.5% |

4.9 Vergleich der Expression von RAR α , RAR β , RAR γ -mRNA in verschiedenen Geweben und Zelllinien

Eine Reihe von Experimenten lasse den Schluß zu, daß eine vermehrte Expression von RAR α vorwiegend in Prostatakarzinomzellen, in Lobund-Wistar-Ratten nach Induktion einer Karzinogenese mittels Nitrosaminen und Androgenen, sowie in menschlichem Prostatakarzinomgewebe vorkommt.

Demgegenüber gibt es eine Reihe von Hinweisen darauf, daß eine vermehrte Expression von RAR γ vorwiegend in benignen Epithelzelllinien von Rattenprostaten (NRP152), in Gewebsschnitten von Rattenprostaten, sowie in Gewebsschnitten von normalem humanen Prostatagewebe vorkommt. Die in Abb. 41 dargestellten Northern-Blots stellen eine Zusammenfassung verschiedener untersuchter Gewebe und Zelllinien hinsichtlich der Expression von RAR α , γ -mRNAs dar.

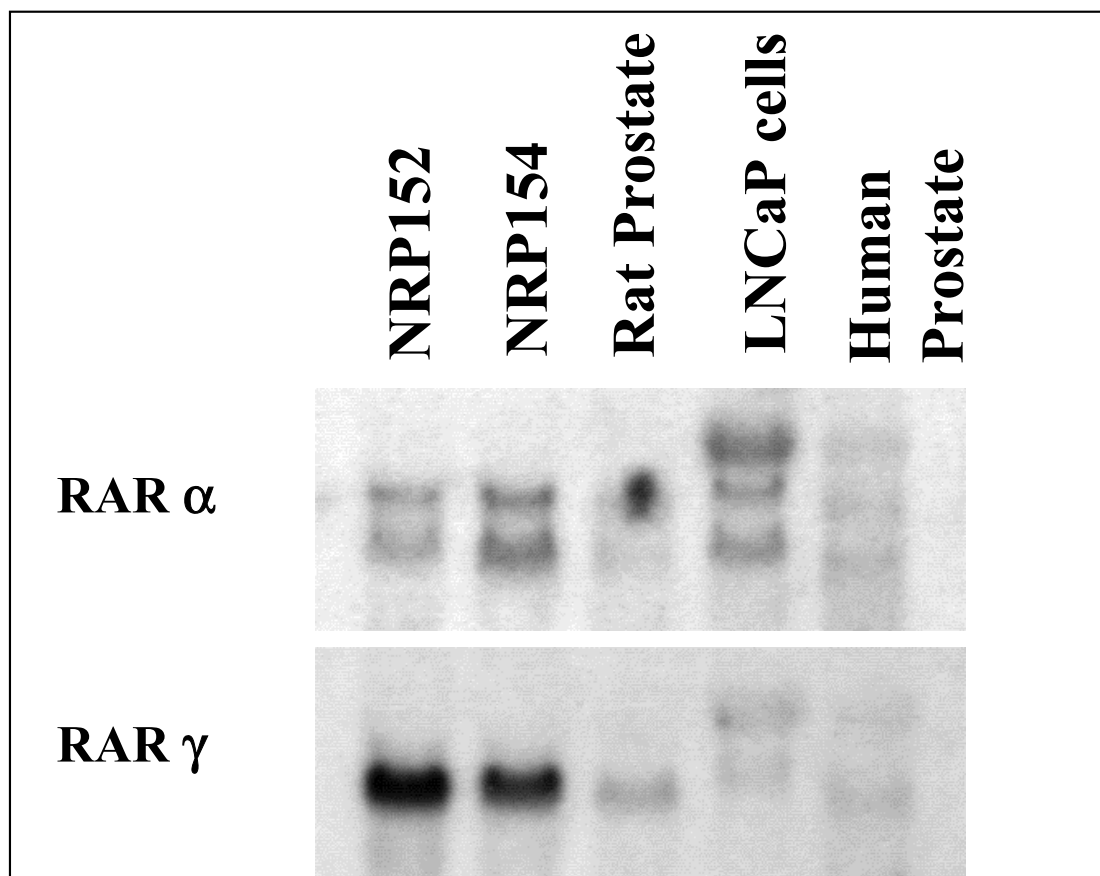


Abb. 42: Unterschiede in der Expression von RAR α -mRNA und RAR γ -mRNA zwischen Prostata und Prostata-Karzinom. Northern blots mit 15 μ g Poly(A)-RNA aus Prostata-Gewebe (Human und Ratte) und den Prostata-Zelllinien NRP152, NRP154 und LNCaP.

5 DISKUSSION

Für den Kliniker ist das Problem der Androgenresistenz beim Prostatakarzinom bislang ungelöst. Während Prostatakarzinome, die mit den derzeit etablierten Staging-Verfahren als "lokalisiert" bezeichnet werden, einer Behandlung durch Radikale Prostatektomie oder Betsrahlung (Brachytherapie oder External Beam oder deren Kombination) mit kurativer Intention zugänglich sind, ist das metastasierende Prostatakarzinom nur palliativ angebar. Die first-line Therapie beinhaltet Androgen-Eliminierung, entweder durch Bilaterale Orchiektomie oder mittels Gabe von GnRH-Agonisten +/- Anti-Androgenen. Dabei ist der Nachweis einer besseren Wirksamkeit einer kompletten Androgenblockade (CAB) gegenüber einer Therapie mit GnRH-Agonisten allein, trotz über 27 prospektiven, randomisierten Studien, nur unzureichend belegt.

Scher et al. haben beobachtet, daß Patienten, die steigende Serum- PSA-Werte unter CAB aufwiesen, nach Absetzen des Anti-Androgens (Flutamid) auf die Therapie mit PSA-Senkung ansprachen. Der Effekt, bekannt als androgen-withdrawal, kann dadurch erklärt werden, daß es im Verlauf der CAB nicht nur zur Selektion von Androgen-resistenten Zellklons, sondern möglicherweise auch zu Mutationen des Androgenrezeptors in Prostatakarzinomzellen kommt. Diese Mutationen könnten die biologische Wirkung des Anti-Androgens (Flutamid) verändern, so daß aus einem Androgen-Inhibitor ein Androgen-Stimulator wird.

Die Anti-Androgen-Behandlung von metastasierenden Prostatakarzinomen mit führt in fast allen Fällen im Zeitraum von 18 bis 36 Monaten zur Androgenresistenz. Damit sind die therapeutischen Optionen weiter eingeschränkt, da chemotherapeutische Ansätze bislang nur unzureichende Wirksamkeit gezeigt haben.

Für uns war die Frage der Androgenrezeptorwirkung interessant, insbesondere die Untersuchung von molekularbiologischen Mechanismen , die einen Einfluß auf die Androgen-Androgenrezeptor-Interaktion haben könnten. Dabei konzentrierten wir uns auf Retinoide und deren Rezeptoren (RARs`), da diese strukturell und funktionell dem Androgenrezeptor und dessen Liganden ähnlich sind. Retinoide haben sich als wirksame Therapie bei der Promyelozytenleukämie erwiesen (Huang et al.) und sind funktionell wirksam als Stimulatoren von Epithelzelldifferenzierung und Zellproliferation (). Retinoide und deren Rezeptoren haben in Zellkulturen, wie frühere Arbeiten aus unserem Labor

zeigten, Wechselwirkungen mit dem Androgenrezeptor und dessen Liganden (Huang et al., 1997). So konnte die Expression des Androgenrezeptors in Zellkulturen durch Gabe von RA modifiziert werden (Huang et al., 1997; Richter et al., 1999), andererseits wurde die Expression der RARs` $\alpha\beta\gamma$ durch Gabe von Testosteron moduliert. Dabei zeigen verschiedene Zelllinien mit unterschiedlicher Stimulierbarkeit durch Androgene auch Unterschiede hinsichtlich des Effekts von RA. So sind die androgenabhängigen LNCaP-Zellen durch

Testosteron stimulierbar und reagieren nach Gabe von Androgenen mit einer Erhöhung der Zellproliferation. Gabe von Retinoiden resultierte ebenfalls in einer Zunahme der Zellproliferation, bis zu einer RA-Konzentration von 0.1 μ M.

Androgenunabhängige Zellen, wie PC3, sind weder durch Testosteron, noch durch Retinoide stimulierbar. Interessanterweise haben erste Versuche, PC3-Zellen mit RAREs` zu transfizieren, biologisch zu einer Stimulierbarkeit durch Androgene und RA geführt (Huang et al., unveröffentlicht). Damit könnten RARs als Target für gentherapeutische Ansätze beim Prostatakarzinom genutzt werden. Ein weiterer Schwerpunkt unserer Untersuchungen konzentrierte sich auf Prostata-Epithelzellen (NRP152) und Prostatakarzinomzellen (NRP154) von Ratten-Prostaten. Diese Zelllinien, die von Danielpour et al () etabliert wurden, erlaubten einen Vergleich von Prostata-Epithelien mit karzinomatös veränderten Prostata-Epithelium im Ratten-Modell (Danielpour et al., 1996). Darüberhinaus ließen sich Vergleiche mit dem von uns verwendeten Tiermodell (Ratte) bei Kastrationsversuchen, hinsichtlich der Lokalisation von RARs` in Gewebsschnitten und der Einfluß einer experimentell induzierten Karzinogenese (Pollard-Modell) auf die Expression von RARs` anstellen. Gen-Arrays erlaubten Aufschluß auf die Unterschiede in der Gen-Expression zwischen NRP152 und NRP154 und dienten zur weiteren Charakterisierung der beiden Zelllinien. Dabei stellte sich heraus, daß nicht nur unterschiedliche Gene im Vergleich zwischen NRP152 und NRP154 exprimiert wurden, sondern sich die beiden Zelllinien auch völlig unterschiedlich hinsichtlich der Stimulierbarkeit mit Testosteron verhielten. Besonders bemerkenswert war die 10fach höhere expression von Interferon- α in NRP154 nach Stimulation mit Testosteron im Vergleich mit NRP152.

NRP154 und NRP152 wiesen unterschiedliches Wachstumsverhalten nach Gabe von RA auf, wobei die Proliferationsrate von NRP152 nach Gabe von RA bis zu einer

Konzentration von 0.1 μ M bis auf das fast 5fache des Ausgangswertes anstieg. Demgegenüber blieb die Proliferationsrate von NRP154-Zellen, trotz einer initial höheren Proliferationsrate, nach Gabe von RA im Vergleich zu NRP152 fast unverändert. LNCaP-Zellen zeigten einen 4fachen Anstieg der Zellproliferation nach Gabe von RA bis zu einer RA-Konzentration von 0.1 μ M. PC3-Zellen waren durch Gabe von RA in ihrem Wachstumsverhalten nicht beeinflussbar.

Androgenbehandlung zeigte sowohl bei NRP152 als auch bei NRP154 einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferationsrate, wobei diese bei NRP152 auf das 8fache des Ausgangswertes, bei NRP154 nur auf das doppelte des Ausgangswertes anstieg. LNCaP-Zellen waren bekanntermaßen ebenfalls durch Testosteron stimulierbar, wobei im angegebenen Konzentrationsbereich ein Anstieg der Zellproliferationsrate auf das 3fache des Ausgangswertes zu beobachten war. PC3 ließen sich, als androgenunabhängige Prostatakarzinomzellen, nicht durch Testosteron im Wachstum beeinflussen. Interessanterweise beobachteten Huang et al. in Experimenten, bei denen PC3 dauerhaft mit Sequenzen von Retinoid Acid Responsive Elements (RAREs) transfiziert wurden, eine Inhibierung der Zellproliferation bei diesen transfizierten PC3-Zellklons nach Gabe von RA (unveröffentlicht).

Um mögliche Mechanismen aufzuklären, die für die Unterschiede der Zellproliferation nach Behandlung mit Retinoiden und Androgenen bei den verschiedenen Zelllinien verantwortlich sind, führten wir Northern-Blots mit cDNAs gegen RAR $\alpha\beta\gamma$, sowie den Androgenrezeptor (AR) durch. Dabei stellte sich heraus, daß RAR α -mRNA vermehrt in NRP154 exprimiert wird, während RAR γ -mRNA vermehrt in NRP152 exprimiert wird. Auch die Expression der AR-mRNA zeigte Unterschiede zwischen NRP154 und NRP152. Wir fanden außerdem nach Behandlung von Testosteron im Sinne eines Dose-Response-Experiments Unterschiede in der Expression von RAR α -mRNA und RAR γ -mRNA bei den Zelllinien NRP154 und NRP152 in Abhängigkeit von der Testosteron-Konzentration. Die Tatsache, daß die Expression von Retinoidrezeptor-RNA durch Androgene beeinflusst werden kann, wurde schon von Huang et al. 1997 in Prostata, Samenblasen und Nieren von Ratten in Kastrationsversuchen gezeigt. Auf Zellkulturebene konnten wir diesen Effekt der Modulation der RAR-RNAs durch Androgene hiermit auch bei LNCaP-Zellen, sowie NRP154 und NRP152 nachweisen. Ein weiterer Bestandteil unserer Untersuchungen, war der Nachweis einer möglichen Stimulation von Proto-Onkogenen und Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, wie sie schon bei LNCaP-Zellen beschrieben wurde (Traisch et al.

1987). Wir konzentrierten uns dabei auf c-myc als Onkogen, und konnten mittels Northern Blot Hybridisierung bei NRP154, nicht aber bei NRP152, eine Stimulation der Expression von c-myc-mRNA durch Testosteronbehandlung nachweisen. Die kanzerogene Zelllinie NRP154 zeigte dabei eine Stimulation der Expression von c-myc-mRNA, wie wir durch Dosis-Wirkungs-Versuche nach Behandlung mit Testosteron unterschiedlicher Konzentration (0 – 200 nM) durch Northern Blot Hybridisierung nachweisen konnten.

Dabei war im zeitlichen Verlauf die Stimulation der c-myc-RNA-Expression schon 15 Minuten nach Androgenbehandlung vorhanden, und war bis zu 3 Stunden nach Behandlung nachweisbar.

Weiterhin konnten wir mittels Western-Blots und Liganden-Bindungs-Assays nachweisen, daß die Expression von EGF-Rezeptor-Protein in NRP154 und NRP152 durch Behandlung mit RA und/ oder Testosteron modulierbar ist. Dabei zeigen beide Zelllinien wiederum Unterschiede in der Expression des EGF-R in Abhängigkeit von Androgen und/ oder Retinoid-Behandlung. Wir vermuten, daß das Gen, das EGF-R-Protein kodiert zu den "down-stream" Genen gehört, die durch Interaktion, sowohl von RA/ RAR, als auch Androgenen mit dem Androgenrezeptor reguliert werden. Beobachtungen über die Modulierung der EGF-R-Expression in Mambranfraktionen aus Prostatagewebe wurden bereits von Traisch et al. (1987 publiziert. In Liganden-Bindungs-Assays konnte nachgewiesen werden, daß nicht nur die Verfügbarkeit des EGF-Rezeptor-Proteins, sondern auch dessen Affinität zu EGF durch Androgene und Retinoide beeinflusst werden kann. Dabei wirken Retinoide inhibierend auf die biologische Verfügbarkeit, als auch die Bindungsaffinität gegen EGF, während Androgene stimulierend wirken. Beide Effekte, sowohl der Androgene als auch der Retinoide, wirkten sich auf die beiden Zelllinien NRP154 und NRP152 graduell unterschiedlich aus.

Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei der Regulierung der IGF-R-Expression durch RA und/ oder Testosteron eine Rolle spielen, wie unsere Liganden-Bindungsassays mit Zellmembranpräparationen von NRP154, NRP152 und LNCaP-Zellen vermuten lassen.

Da die Prostatakarzinomzelllinien NRP152 und NRP154 aus Rattenprostaten bevor und nach Induktion einer Karzinogenese durch Gabe von Methyl-Nitrisoharnstoff IV in die Schwanzvene gefolgt von einer subkutanen Implantation einer Depot-Testosteron-Kapsel (Pollard et al.), waren wir daran interessiert, die Expression der RARs` während der

Karzinogenese im Ratten-Modell (Lobund-Wistar-Ratten) zu verfolgen. Als Detektion der Expression der RAR-mRNAs wurde RT-PCR mit von Cunha et al. angegebenen Primern für RAR $\alpha\beta\gamma$ verwendet, da aufgrund der zur Verfügung stehenden geringen Mengen an Prostatagewebe eine Northern-Blot-Hybridisierung nicht infrage kam. Dabei zeigte sich mittels RT-PCR, daß im Verlauf der experimentell über einen Zeitraum von 10 Monaten induzierten Karzinogenese, bei der etwa 90% der Tiere ein histologische Veränderungen im Sinne eines Prostatakarzinoms im H/E-gefärbten Gewebsschnitt aufwiesen, die Expression von RAR α -mRNA zunahm die Expression der RAR γ -mRNA jedoch abnahm. Dies steht in Übereinstimmung mit unseren Northern Blot Hybridisierungen mit den Zelllinien NRP152 und NRP154. Im Gewebsschnitt ließen sich ebenfalls die Zunahme der Expression von RAR α und die Abnahme der Expression von RAR γ im Verlauf der Karzinogenese durch jeweilige Zu- oder Abnahme der nukleären Färbung mittels Meerrettichperoxidase-Reaktion bei der Immunhistochemie mit Antikörpern gegen RAR α und RAR γ semiquantitativ nachweisen. Weiterhin lassen die Ergebnisse unserer immunhistochemischen Untersuchungen erkennen, daß tatsächlich nur Zellkerne von karzinomatös veränderten Zellen verstärkte Immunreaktivität gegen den anti- RAR α -Antikörper aufwiesen, wobei die unveränderten Zellen verstärkte Immunreaktivität gegen den verwendeten anti-RAR γ -Antikörper zeigte.

LITERATURVERZEICHNIS

- Coffey, D. S. (1988). Androgen action and the sex accessory tissues. In: The Physiology of Reproduction. (Knobil E, Neill JD, eds) Raven Press, p.1081-1119.
- Lee, C., Sensibar, J. A., Dudek, S. M., Hiipakka, R. A. and Liao, S. (1990). Prostatic ductal system in rats: Regional variation in morphological and functional activities. Biol. Reprod. 43: 1079-1086.
- Kyprianou, N. and Isaacs, J. T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. Endocrinology 122: 552-562.
- Wolbach, S. and Howe, P. R. (1925). Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. J. Exp. Med. 42: 753-777.
- Whitmore, W. F. Jr (1973). The natural history of prostatic cancer. Cancer 32: 1104-1112
- Lee, C., Kozolowski, J. M. and Grayhack, J.T. (1995). Ethology of benign prostatic hyperplasia. Adv. Benign Prostatic Hyperplasia 22: 237-246.
- Pollard, M., Luckert, P. H. and Sporn, M. B. (1991). Prevention of primary prostate cancer in Lobund Wistar rats by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide). Cancer Res. 51: 3610-3611.
- Pienta, K. J., Nguyen, N. M. and Lehr, J. E. (1993). Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretimide. Cancer Res. 53: 224-226.
- Stearns, M. E., Wang, M. and Fudge, K. (1993). Liarozole and 13-cis-retinoic acid anti-prostatic tumor activity. Cancer Res. 53: 3073-3077.

- Griffiths, K., Akaza, H., Eaton, C. L., Etreby, M. E., Habib, F., Lee, C., Partin, A. W., Coffey, D.S., Sciarra, F., Steiner, G. and Tenniswood, M. P. (1993). Regulation of prostate growth. In: The Proceeding of the Second International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). A. T. K. Cockett, S. Khoury et al., Eds), Scientific Comm. Intl. Ltd. Proc. 2: 49-74.
- McKeehan, W.L., Adams, P. S., Rosser, M. P. (1984). Direct effects of insulin, epidermal growth factor, glucocorticoid, cholera toxin, unknown pituitary factors and possibly prolactin, but not androgen, on normal rat prostate epithelial cells in serum-free, primary cell culture. *Cancer Res.* 44: 1998-2010.
- Schuurmans, A. L. G., Bolt, J., Voorhorst, M. M., Blankerstein, R. A. and Mulder, E. (1988). Regulation of growth and epidermal growth factor receptor levels of LNCaP prostate tumor cells by different steroids. *Int. J. Cancer* 42: 917-922.
- Traish, A.Mnderten . and Wotiz, H.H. (1987). Prostatic epidermal growth factor receptors and their regulation by androgen. *Endocrinology* 121: 1461-1467
- Turkeri, L. N. and Wykes, S. M. (1994). Comparative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression and protein product in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *Prostate* 25: 205 – 207.
- Peehl, D. M., Wong, S.T. and Stamey, T. A. (1993). Vitamin A regulates proliferation and differentiation of human prostatic epithelial cells. *Prostate* 23: 69-78.
- Esquenet, M., Swinnen, J. V., Heyns, W. and Verhoeven, G. (1996). Control of LNCaP proliferation and differentiation: Actions and interactions of androgens, 1 α , 25-dihydroxycholecalciferol, all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid and phenylacetate *Prostate* 28: 182-194.
- Fong, C. J., Sutkowski, D. M., Braun, E. J., Bauer, K. D., Sherwood, E. R., Lee, C. and Kozlowski, J. M. (1993). Effect of retinoic acid on the proliferation and secretory activity of androgen responsive prostatic carcinoma cells. *J. Urol.* 149:1190-1194.

- Young, C. Y. F., Montgomery, B. T., Andrews, P. E., Qiu, S., Bilhartz, B.L. and Tindall, D. J. (1991). Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res.* 53: 3748-3752.
- Danielpour, D. (1996). Induction of transforming growth factor- α autocrine activity by all trans-retinoic acid and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 in NRP-152 rat prostatic epithelial cells. *J. Cell Physiol.* 166: 231-239.
- Chabon, P. (1995). The molecular and genetic dissection of the retinoid signal pathway. *Recent Prog. Horm. Res.* 50: 317-332.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.
- Huang, H. F. S., Li, M. T., Von Hagen, S., Zhang, Y. F. and Irwin, J. R. (1997). Androgen modulation of the messenger ribonucleic acid of retinoic acid receptors in the prostate, seminal vesicles and kidney in the rat. *Endocrinology* 138: 553-559.
- Li, M. T., Huang, F. S. H., Richter, F., Aresta, S. A. and Irwin, R. J. (2000). Interaction of testosterone and retinoic acid in LNCaP cells. Effects on cell growth and the expression of retinoic acid receptors and epidermal growth factor receptor. Prostate (submitted)
- Danielpour, D., Kadomatsu, K., Anzano, M. A., Smith, J. M. and Sporn, M.B. (1994). Development and characterization of nontumorigenic and tumorigenic epithelial cell lines from rat dorsal-lateral prostate. *Cancer Res.* 54: 3413-3421.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single step method of mRNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Aviv, H. and Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger mRNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N. Y. Cold Spring Harbor Press.
- Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P. and Chambon, P. (1989). Cloning of murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor predominately expressed in skin. *Nature* 339: 714-717.
- Krust, A., Kastner, P., Petkovich, M., Zelent, A. and Chambon, P. (1989). A third human retinoic acid receptor, h-RAR- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5310-5314.
- Wang, S. L., Shiverick, K.T., Ogilvie, S., Dunn, W. A. and Raizada, M. K. (1989). Characterizations of epidermal growth factor receptors in astrocytic glial and neuronal cells in primary culture. *Endocrinology* 36: 129-134.
- Geisen, C., Denk, C., Gremm, B., Baust, C., Karger, A., Bollag, W. and Schwarz, E. (1997). High-level expression of the retinoic acid receptor β gene in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor α and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* 57: 1460-1467.
- Nervi, C., Vollberg, T. M., George, M. D., Zelent, A., Chambon, P. and Jetten, A. M. (1991). Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and in lung carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 195: 163-170.
- Zhang, X. K., Liu, Y., Lee, M. O. and Pfahl, M. A. (1994). A specific defect in the retinoic acid response associated with human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 54: 5663-5669.
- Roman, S. D., Clarke, C. L., Hall, R. E., Alexander, I. E. and Southerland, R. L. (1992). Expression and regulation of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 52: 2236-2242.
- McKeehan, W. L. Growth factor receptors and prostate cell growth. *Cancer Surv.* 11: 165-175.

- Goustin, A. S., Leof, E. B., Shipley, G. D. and Moses, H. L. (1986). Growth factors and cancer. *Cancer Res.* 46: 1015-1029.
- Zhang, Z. S. and Goldsmith L. A. (1990). Modulation of epidermal growth factor receptors by retinoic acid in ME180 cells. *Cancer Res.* 50: 1201-1205.
- Bosland, M.C. (1992). Animal models for the study of prostate carcinogenesis. 16: 89-98.
- Pugh, T.D., Chang, C., Uemura, H. und Weindruch, R. (1994). Prostatic localization of spontaneous early invasive carcinoma in Lobund-Wistar rats. *Cancer Res.* 54: 5766-5770.
- Pollard, M. (1973). *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1235-1241.
- Kallio, P.J., Palvimo, J.J., und Jänne, O.A.: Genetic Regulation of Androgen Action (1996). *The Prostate* 6: 45-51.
- Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T. et al. (1997). Androgen Receptor Gene Amplification: A Possible Molecular Mechanism for Androgen Deprivation Therapy Failure in Prostate Cancer. 57: 314-319.
- Russel, P.J., Bennett, S. und Stricker, P.(1998): Growth factor involvement in progression of prostate cancer. 44: 705-723.
- Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Kakizuka, A., Umesono, K. und Evans, R.M.: Retinoid Receptors. (1993). *Recent Progress in Hormone Research* 48: 99-121.
- Saeed Sheikh, M., Shao, A.-M., Chen, J.-C., Ordonez, J.V. und Fontana, J.A. (1993): Retinoid Modulation of c-myc and max Gene Expression in Human Breast Carcinoma. *Anticancer Research* 13: 1387-1392.

- Jing, Y., Waxman, S., und Mira-y-Lopez, R.: The Cellular Retinoic Acid Binding protein II is a positive Regulator of Retinoic Acid Signaling in Breast Cancer Cells. (1997). *Cancer Res.* 57: 1668-1672.
- Kokontis, J., Takakura, K und Liao, S. (1994). Increased Androgen Receptor Activity and altered c-myc Expression in Prostate Cancer Cells after long-term Androgen Deprivation. 54: 1566-1573.
- Middleman, M.N., Lush, R.M., Sartor, O., Reed, E. und Figg, W.D. (1996). Treatment approaches for metastatic cancer of the prostate based on recent molecular evidence. 22: 105-118.
- Karp, J.E., Chiarodo, A., Brwley, O. und Kelloff, G.J. (1996). Prostate cancer prevention: Investigational approaches and opportunities. *Cancer Res.* 56: 5547-5556.
- Chomienne, C., Fenaux, P., und degos, L. (1996). Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB* 10: 1025-1030.
- Lippmann, S.M., Brenner, S.E. und Hong, W.K. (1994). Cancer Chemoprevention. *J. Clin. Oncol.* 12: 851-873.
- Wilson, J.G., Roth, C.B. und Warkany. (1953). *Am .J. Anat.* 92: 189-217.
- VanPelt, H.M.M. und Rooij, D.G. (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A – deficient rats and high replicates doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology* 128: 697-704.
- Buttyn, R. und Slawin, K. (1993). Rodent models for targeted oncogenesis of the prostate gland. *Cancer Metastasis Rev.* 12: 11-19.
- Quigley, C.A., DeBellis, A., Marschke, K.B., El-Awady, M.K., Wilson, E.M. und French, F.S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr. Rev.* 16: 271-321.

- LaSpade, A.R., Roiling, D.B., Harding, A.E., Warner, C.L., Spiegel, R., Hausmanowa-Petruscewicz, I. und Yee, W.-C. (1992). Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature genet.* 2: 301-304.
- P., Easton, D.F., Ponder, B.A.J. Wooster, R., Mangion, J., Eeles, R., Smith, S., Dowsett, M., Averill, D., Barret-Lee, und Stratton, M.R.(1992). A germline mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifenstein syndrome. *Nature Genet.* 2: 132-134.
- Lobaccaro, J.-M., Lumbroso, S., Balon, C., Galtier-Dereure, F., Bringer, J., Lesimple, T., Namer, M., Cutuli, B.F., Pujol, H. und Sultan, C. (1993). Androgen receptor gene mutation in male breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1799-1802.
- Klocker, H., Culig, Z., Hobisch, A., Cato, A.C.B. und Bartsch, G. (1994). Androgen receptor alterations in prostatic carcinoma. *Prostate* 35: 266-273.
- Taplin, M.-E., Burley, G.J., Shuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N. und Balk, S.P.(1991). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med.* 322: 1393-1398.
- Blutt, S.E., Allegretto, E.A., Pike, J.W. und Weigel, N.L. (1997). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and 9-cis retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cancer cells and cause accumulation of cells in G1. *Endocrinology* 138: 1491-1497.
- Campbell, M.J., Park, S., Uskokovic, M.R., Dawson, M.I. und Koeffler, M.R. (1998). Expression of retinoid acid receptor- β synthetizes prostate cancer cells to growth inhibition mediated by combination of retinoids and a 19-nor hexafluoride vitamin D3 analog. *Endocrinology* 139: 1972-1980.
- Danielpour, D. (1996). Induction of transforming growth factor- β autocrine activity by an all trans-retinoic acid and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in NRP-152 rat prostatic epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 166: 231-239.

- Richter, F., Huang, H.F.S., Li, M.-T., Danielpour, D., Wang, S.-L. und Irwin, R.J. (1999). Retinoid and androgen regulation of cell growth, epidermal growth factor and retinoic acid receptors in normal and carcinoma rat prostate cells. *Molecular and Cell. Endocrinol.* 153: 29-38.
- Chopra, D.P und Wilkoff, L.J. (1977). β -retinoic acid inhibits and reverses testosterone-induced hyperplasia in mouse prostate organ culture. *Nature* 263: 339-341.
- Hwang, M.S., Thompson, K.L. und Ahn, C.H. (1995). P53-independent induction of p21(WAF1) and apoptosis by all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid in a human prostate cancer cell line. *AACR* 36: A57.
- lio, K.Y., Sensibar, J.A. und Lee, C. (1995). Effect of TGF- β , TGF- α , and EGF on cell proliferation and cell death in rat ventral prostatic epithelial cells in culture. *J. Androl.* 16: 482-490.
- Jutley, J.K., Reaney, S., Kelleher, J. und Whelan, P. (1990). Interactions of retinoic acid and androgens in human prostatic tissue. *Prostate* 16: 229-304.
- Jesik, C.J., Holland, J.M. und Lee, C. (1982). An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 3: 81-97.
- Kokontis, J., Ito, K., Hiipakka, R.A. und Liao, S. Expression and function of normal and LNCaP androgen receptors in androgen insensitive human prostatic cancer cells: altered hormone and anti-hormone specificity in gene transactivation. *Receptor* 1: 271-279.
- Kyprianou, N. und Isaacs, J.T. (1988). Identification of a cellular receptor for transformin growth factor - β in rat ventral prostate and its negative regulation by androgen. *Endocrinology* 123: 2124-2131.
- Lotan, R. (1980). Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *BBA* 605: 33-91.

- Kolonel, L.N., Hankin, J.H. und Yshizawa, C.N.(1987). Vitamin A and prostate cancer in elderly men: Enhancement of risk. *Cancer Res.* 47: 2982-2985.
- Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A. und Evans, R.M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid receptor pathway. *Nature* 345: 224-229.
- Moon, R.C.(1983) Inhibition of carcinogenesis by retinoids. *Cancer res.* 43: 24696-24755.
- Ohno, Y., Yoshida, O., Oishi, K., Okada, K., Yamabe, H. und Schröder, F.H. (1988). Dietary β -carotene and cancer of the prostate: a case-control study in Kyoto, Japan. *Cancer Res.* 48: 1331-1336.
- Reese, D.H., Gordon, B., Gratzner, H.G. (1983). Effect of retinoic acid on the growth and morphology of a prostatic adenocarcinoma cell line cloned for the retinoid inducibility of alkaline phosphatase. *Cancer Res.* 43: 5443-5450.
- Reichman et al. (1990). Serum vitamin A and subsequent development of prostate cancer in the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *Cancer Res.* 50: 2311-2315.
- Sporn, M.B., Dunlop, M.N., Newton, D.L. und Smith, J.M. (1976). Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed. Proc.* 35: 1332-1338.
- Sporn, M.B.und Roberts, A.B. (1991). Interactions of retinoids and transforming growth factor- β in regulation of cell differentiation and proliferation. *Mol. Endocrinol.* 5: 3-7.
- Scatchard, G. (1949). Attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad. Sci.* 51: 660-672.
- Strickland, S. und Mahdavi, V.(1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoid acid. *Cell* 15: 393-403.

- Tanji, N., Yokoyama, M., Takeuchi, M., Terada, N., Dahiya, R. und Cunha, G.R. (1996). Inhibitory effects of retinoic acid on androgen-dependent development of neonatal mouse seminal vesicles in vitro. *Endocrinology* 137: 2887-2895.
- Thompson, J.N., Howell, J.M.C. und Pitt, G.A.J. (1964). Vitamin A and reproduction in the rat. *Proc. Royal Soc. B* 159: 510-534.
- Thompson, J.N., Howell, J.M.C, Pitt, G.A.J. und McLaughlin, C.I. (1969). The biological activity of retinoic acid in domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo. *Br. J. Nutr.* 23: 471-490.
- Thompson, K.L. und Rosner, M.R. (1989). Regulation of epidermal growth factor receptor gene expression by retinoic acid and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 264: 3230-3234.
- Thompson, K.L., Hwang, M.S., Chai, W.C., Rhim, J.S. und Ahn, C.H. (1995). Differential regulation of growth arrest-associated gene products by 9-cis retinoic acid in human prostate transformed epithelial cells and carcinoma cell lines. *AACR* 36: 1597A.
- Toma, S., Isnardi, L., Raffo, P., Dastoli, G., DeFrancisci, E., Riccardi, L., Palumbo, R. und Bollag, W. (1997). Effects of all-trans retinoic acid and 13-cis-retinoic acid on breast cancer cell lines: growth inhibition and apoptosis induction. *Int. J. Cancer* 70:619-627.
- Young, C.Y.F., Murtha, P.E., Andrews, P.E., Lindsey, J.K. und Tindall, D.J.(1994) Antagonism of androgen action in prostate tumor cells by retinoic acid. *Prostate* 25: 39-45.
- Haq, R.U., Pfahl, M. und Chytil, F. (1991). Retinoic acid affects the expression of nuclear retinoic acid receptors in tissues of retinal-deficient rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8272-8276.

- Mellon, K., Thompson, S. und Cheuton, R. (1992). P53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J. Urol.* 147: 496-499.
- Geisen, C., Denk, C., Gremm, B., Baust, C., Karger, A., Bollag, W. und Schwarz, E. (1997). High-level expression of the retinoic acid receptor- β gene in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor- α and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer res.* 57: 1460-1467.
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P. und Evans, R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330: 624-629.
- Giguere, V., Shago, M., Zirngibl, R. et al. (1990). Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor- γ expressed in the mouse embryo. *Mol. Cell. Biol.* 10: 2335-2340.
- Roman, S.D., Clarke, C.L., hall, R.E., Alexander, I.E. und Southerland, R.L. (1992). Expression and regulation of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 52: 2236-2242.
- Roman, S.D., Ormandy, C.J., Manning, D.L., Blamey, R.W., Nicholson, R.I., Southerland, R.L. und Clark, C.L. (1993). Estradiol induction of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer res.* 53: 5940-5945.
- Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M. Keinänen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J. und Kallioniemi, O.-P.(1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature Genet.* 9: 401-406.
- Kessel, M. (1992). *Development* 115: 487-501.
- Leid, M., Kastner, P. und Chambon, P. (1992). *Trends Biochem. Sci.* 17: 427-433.

Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J.Y., Staub, A., Garnier, J.M., Mader, S. und Chambon, P. (1992). *Cell* 68: 377-395.

Underwood, J.N. (1984). In: "The Retinoids" (Eds.: M. B. Sporn, A.B. Roberts und D.S. Goodman), Vol. 1, pp. 282-392. Academic Press, Orlando, FL.

Wald, G. (1968). *Science* 162: 230-239.

Wolbach, S.B. und Howe, P.R. (1925). *J. Exp. Med.* 42: 753-777.

Huggins, C. und Hodges, C.F. (1941). *Cancer Res.* 1: 293-297.

Huggins, C. Stevens, R.E., und Hodges, C.F. (1941). *Arch. Surg.* 43: 209.

Horoszczewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J..P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., und Murphy, G.P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43: 1818.

THESEN

Der Effekt der Androgen-Eliminierung beim Prostatakarzinom sind seit den Kastrationsversuchen von Higgins et al. belegt. Molekularbiologische Untersuchungen am Androgenrezeptor, insbesondere die Klonierung des Androgenrezeptor-Gens durch Liao trugen zum weiteren Verständnis der Mechanismen der Androgenwirkung bei.

Retinoide sind Steroide, Derivate des Vitamin A, die ihre Wirkung durch Interaktion mit Retinoid-Rezeptoren, lokalisiert im Zellkern, entfalten. Diese Retinoid-Rezeptoren, von denen eine Reihe von Sub-Typen charakterisiert wurde, weisen erstaunliche Ähnlichkeiten mit dem Androgenrezeptor auf. Das trifft sowohl strukturell als auch funktionell, im Hinblick auf deren Funktion als Transkriptionsfaktoren, zu.

Retinoide wurden als Therapeutikum bei verschiedenen Karzinomen in der Vergangenheit erfolgreich angewandt. Überzeugendstes Beispiel ist der Einsatz von Retinoiden als Therapeutikum bei der Promyelocyten-Leukämie, ein Malignom das nachgewiesen durch strukturelle Veränderungen an einem der Retinoid-Rezeptor-Subtypen verursacht wird.

Experimentelle Arbeiten an Zellkulturen haben einen inhibierenden Effekt von Retinoiden auf das Zellwachstum verschiedener Malignom-Zellen, insbesondere beim Prostatakarzinom, nachgewiesen.

Eigene Untersuchungen zeigten, daß der Effekt von Retinoiden auf das Zellwachstum von Prostata-Epithelzellen und Prostatakarzinomzellen keiner einfachen Kinetik folgt, sondern neben der Abhängigkeit von der Retinoid-Dosis, auch von der Zelllinie, insbesondere deren Androgenrezeptor abhängt. So zeigten LNCaP-Zellen (androgenabhängig, mit Androgenrezeptormutation) Unterschiede in der Zellproliferation im Vergleich zu PC3 (androgenunabhängig) oder NRP154 (Prostatakarzinom Ratte) und NRP152 (Prostataepithel Ratte). Die beiden letzteren Zelllinien erschienen interessant, da sie einen Vergleich zwischen Karzinomzellen und benignen Epithelzellen ermöglichen und darüber hinaus Vergleiche bei der Karzinogenese des Prostatakarzinoms im Tiermodell (Lobund-Wistar-Ratten, Pollard-Modell) ermöglichen.

Die beobachteten Effekte der Retinoidwirkung bei verschiedenen Prostata-Zelllinien (benigne und maligne) ließen Interaktionen von Retinoiden mit dem Androgenrezeptor und/ oder Androgen-Interaktion mit Retinoid-Rezeptoren vermuten.

Northern-blots mit Poly(A)RNA von verschiedenen Prostata-Zelllinien (benigne und maligne) nach Behandlung mit Retinoic acid (RA) bestätigte dosisabhängige Unterschiede in der Expression der Androgenrezeptor (AR)-mRNA.

Umgekehrt verursachte die Behandlung mit Testosteron in verschiedenen Prostata-Zelllinien (benigne und maligne) Unterschiede in der Expression der Retinoid-Rezeptor-mRNA für RAR α und RAR γ .

Die Ergebnisse, die in (7) und (8) zusammengefaßt sind unterstützen somit die Hypothese einer Interaktion von Retinoiden und Androgenen mit deren Rezeptoren auf RNA-Ebene.

Western Blot Analysen wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Expression der Retinoid-Rezeptoren RAR α and RAR γ nach Gabe von Testosteron Unterschiede auf Protein-Ebene aufweist.

Beim Vergleich von malignen und benignen Prostataepithelzellen zeigten sowohl Northern-als auch Western-Blots eine vermehrte Expression von RAR α -mRNA, als auch RAR α -Protein bei der Karzinomzelllinie NRP154, im Gegensatz zu NRP152. Die Expression von RAR γ -mRNA und RAR γ -Protein verhielt sich genau entgegengesetzt.

Untersuchungen an humanem Prostatagewebe bestätigten Unterschiede in der Expression von RAR α mRNA und RAR γ mRNA mittels RT-PCR. Western Blots mit Protein-Lysaten von humanem Prostata- und Prostata-Karzinomgewebe bestätigten die Unterschiede in der Expression von RAR α und RAR γ auf Protein-Ebene.

Durch immunhistochemische Untersuchungen an humanem Prostatagewebe mit Antikörpern gegen RAR α und RAR γ konnten deren Lokalisation und Expression nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich wiederum eine erhöhte Immunreaktivität von RAR α beim Prostatakarzinom, im Gegensatz zu RAR γ , das bei benignem Prostataepithelium deutlich stärkere Immunreaktivität aufwies.

Das von Pollard et al. entwickelte Tiermodell der Karzinogenese eines Prostatakarzinoms bei der Ratte, verwendet Lobund-Wistar-Ratten, die schon spontan ein Prostatakarzinom entwickeln können. Durch einmalige Gabe des Karzinogens Methyl-nitroso-Harnstoff (MNU) i.v. und kontinuierliche Gabe von Testosteron (als subkutane slow-release Applikation) kann die Chance der Karzinomentstehung erhöht werden. Bei unseren eigenen Untersuchungen entwickelten 90% der so behandelten Tiere nach 10 Monaten ein histologisches Prostatakarzinom.

Immunhistochemische Untersuchungen am Rattenmodell lieferten Resultate, die denen am menschlichen Prostatakarzinom entsprechen. Während RAR γ initial und in den unbehandelten Kontrollgruppen stärkere Immunreaktivität in Gewebsschnitten und Western blots zeigte, nahm die Expression von RAR α im Verlauf der Karzinogenese zu - die Immunreaktivität von RAR γ dagegen nahm im Verlauf der Karzinogenese ab.

Androgene entfalten ihre Wirkung nach Bindung an den im Zellkern lokalisierten Androgenrezeptor als Transkriptionsfaktoren, wobei die Expression von Genen aktiviert wird, die verschiedenartige Proteine kodieren mit unterschiedlichen Funktionen innerhalb der Zelle. Ein Teil dieser Proteine ist nicht im Zellkern, sondern an der Zellmembran lokalisiert, z.B. EGFR IGF-1R und PSMA.

Danielpour et al. zeigten Unterschiede in der Expression von TGF β nach Gabe von Retinoiden und vermuten, daß RA- Effekte auf das Zellwachstum durch TGF β vermittelt werden.

Unsere eigenen Untersuchungen zielten darauf ab, den Einfluß von Retinoid-Gabe auf die Expression von EGFR zu untersuchen, von dem bekannt ist, daß die Expression durch Androgene stimuliert werden kann (Traisch). Im Vergleich der Karzinomzelllinie NRP154 gegenüber NRP152 zeigte sich EGFR in Western Blots stärker in der Karzinomzelllinie exprimiert. Liganden-Bindungs-Assays mit Zellmembranen von NRP154 und NRP152 mit [125 I]-EGF zeigten, daß die Gabe von Retinoiden in einer Konzentration von 0.1 μ M nicht nur die EGFR-Verfügbarkeit, sondern auch dessen Bindungsaffinität verminderte.

Liganden-Bindungs-Assays mit Zellmembranen von NRP154 und NRP152 mit [125 I]-IGF1 zeigte eine Reduzierung der Rezeptorexpression, sowohl auch der Bindungsaffinität des IGF-Rezeptors.

Zusammenfassend belegen unsere Untersuchungen, daß Retinoide einen meist wachstumshemmenden Effekt auf Prostatakarzinomzelllinien verursachen, der wahrscheinlich neben Bindung an Retinoid-Rezeptoren (RARs) durch Interaktion mit dem Androgenrezeptor (AR), vermittelt durch Hemmung verschiedener membrangebundener Zellproteine und Rezeptoren, verursacht wird. Weiterhin konnten wir zeigen, daß sich im Verlauf der Prostata-Karzinogenese im Tiermodell, die Expression der Retinoid-Rezeptoren RAR α und RAR γ umkehrt, was möglicherweise das verschiedene Wachstumsverhalten, als auch Unterschiede der Zellproliferation nach Gabe von Retinoiden in normalen Epithelzellen gegenüber Prostatakarzinomzellen erklärt.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle sei allen gedankt, ohne deren Mitarbeit und Hilfe das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ri 773/2-1) unterstützt. Weitere Forschungsförderung wurde durch Mittel der NIH, des V.A.-Rehab R&D-Grants B885-2RA (Dr.H. Huang) und des C.R.-Bard-Endowed-Fund zur Verfügung gestellt. Dr. Hosea F.S. Huang, PhD., Associate Professor, Department of Surgery/ Section of Urology, UMDNJ, gebührt mein Dank, da ich durch Ihn auf das Forschungsthema hingelenkt und über viele Jahre hinweg großzügige Unterstützung, sowohl methodisch als auch beim Herangehen an wissenschaftliche Fragestellungen erhielt. Der Großteil der Versuche wurde in Dr. Huang's` Labor durchgeführt, ein beträchtlicher Teil der Fördermittel wurde von ihm zur Verfügung gestellt. Dr. Frank Fromowitz, Chief Sugical Pathology, UMDNJ, Newark, bin ich zu Dank verpflichtet für seine bereitwillige Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung von Prostatagewebe und einen Teil der angefertigten Gewebsschnitte. Ein Teil der Versuche konnte ich am George-O`Brian- Research-Center/ Department Urology am Sloan-Kettering- Cancer Center, New York durchführen. Dafür gebührt mein Dank insbesondere Dr. Warren D.W. Heston, PhD., der als Leiter des Labors wesentlichen Anteil an den Arbeiten an Endothelzellkulturen hatte und dessen renommiertes Labor darüberhinaus optimale Voraussetzungen für wissenschaftliches Arbeiten bot. Weiterhin gebührt mein Dank Dr. P. Scardino, der als Chairman des Department of Urology, Memorial-Sloan-Kettering Cancer Center, mir die Möglichkeit bot, in seiner Abteilung zu arbeiten.

Für methodisch- technische Unterstützung bin ich insbesondere Dr. Min-Tang Li, Section of Urology, UMDNJ, verpflichtet, der mich in der Ausführung grundlegender molekularbiologische Techniken unterwies – namentlich RNA und DNA-Isolierung, sowie Norther Blot Hybridisierung. Seine konstant reproduzierbar guten Analysen im Vergleich zu eigenen Resultaten haben mich erkennen lassen, daß es ein weiter Weg zur Meisterschaft ist und ich mich allenfalls als Novize bezeichnen darf. Frau Maria Bisognia, Laborassistentin am George-O`Brian –Research- Center, verdanke ich Unterstützung bei der Durchführung und Fehlersuche bei Western blots und bei der Korrektur von Manuskripten. Denise O`Keefe, PhD. und Dean J. Bacich, PhD. regten durch zahlreiche Diskussionen immer wieder zusätzliche Untersuchungen an, die in den Rahmen der vorliegenden Arbeit einfließen.

Frau Dr.E. Rydan, Leiterin des Tierversuchslabors, UMD- New Jersey Medical School, bin ich für einen Großteil der Pflege und Unterbringung der Versuchstiere und ihrer Unterstützung beim Zustandekommen und der Befürwortung des Tierversuchsprotokolls sehr dankbar.

Herrn Markus Meierhofer, Technischer Mitarbeiter des Departments of Anatomy, UMDNJ, gebührt mein Dank für seine fleißige und bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung von Gewebsschnitten, histologischen Färbungen und immunhistochemischen Untersuchungen.

Zahlreiche weitere, namentlich nicht zu nennende, Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Urology Research Laboratory, UMD- New Jersey Medical School, sowie des George-O`-Brian – Research Center, MSKCC, New York, trugen durch ihre fleißige und gewissenhafte Kooperation wesentlich zur Bereicherung der vorliegenden Arbeit bei.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Chef, Dr. R. Irwin Jr., Chairman Section of Urology, UMDNJ, Dank aussprechen, der mir nicht nur hinsichtlich meiner klinischen Ausbildung alle denkbare Unterstützung hat zukommen lassen, sondern stetes Interesse an meinen experimentellen Arbeiten hatte. Er war es, der mir die Türen öffnete, die sowohl eine fundierte klinische Ausbildung als auch ein kontinuierliches experimentelles Arbeiten in seiner Abteilung ermöglichten.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre, daß ich die der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität Berlin zur Habilitation eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Interaktion von Retinolsäurerezeptoren und Androgenrezeptor bei
Androgen- und Retinoid- Stimulation von Prostatazellen und
Prostatakarzinomzellen
- möglicher Ansatz zur Therapie des Prostatakarzinoms**

selbständig und ohne sonstige Hilfe angefertigt habe. Bei der Abfassung wurden keine anderen Hilfsmittel als die genannten benutzt.

Bei der Abfassung der Habilitationsschrift sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe die Habilitationsschrift bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule/ Universität zur Habilitation eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität Berlin das Recht, weitere Kopien meiner Habilitationsschrift herzustellen und zu vertreiben.

Newark, USA, den 20. April 2001

Dr. med. Frank Richter